



Université de Montréal

# **Étude des mécanismes d'entrée en sénescence suite à une dysfonction de la chromatine télomérique**

par Sabrina Ghadaouia

Faculté de médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Biologie Moléculaire  
option Générale

Juin 2016

© Sabrina Ghadaouia, 2016

## Résumé

La sénescence répllicative est le phénomène associé à un arrêt de croissance permanent causé par le raccourcissement progressif des télomères à chaque division. Lorsqu'ils atteignent une longueur critique, les télomères perdent leur structure terminale protectrice en t-loop, ce qui révèle l'extrémité du chromosome et déclenche une Réponse aux dommages à l'ADN (RDA) p53-dépendante. Le nombre de télomères ouverts nécessaire à la mise en place de la sénescence n'est pas connu, mais plusieurs évidences suggèrent que la cellule pourrait en tolérer un certain nombre avant de s'arrêter définitivement. Dans ce projet, nous utilisons un dominant négatif de Tin2 (Tin2DN), un membre du complexe nucléo-protéique nommé le télosome qui stabilise la t-loop, pour démontrer que la dysfonction chromatinienne télomérique seule ne suffit pas à déclencher un arrêt de croissance permanent. Lorsqu'il est exprimé, Tin2DN induit la formation de foyers de dommages de 53BP1, la RDA ainsi qu'un arrêt de croissance transitoire. De façon surprenante, nous observons que les cellules qui ont subi ce premier arrêt de croissance ré-entrent dans le cycle cellulaire et se divisent, et ce malgré la présence de foci télomériques. Cette réentrée cause l'apparition de cassures secondaires ainsi qu'une accumulation d'instabilités génomiques, telles que des ponts chromosomiques ou des micro-noyaux. Cet échappement des points de blocages du cycle cellulaire pourrait être expliqué par notre observation que la dysfonction télomérique induite par Tin2DN n'active que très faiblement p53 et p21, et pratiquement pas la kinase Chk2. Néanmoins, en inhibant directement l'activité de p53, nous n'observons plus aucun arrêt de croissance mais une accumulation de foci et d'instabilités génomiques, avec une forte occurrence de catastrophes mitotiques. L'ensemble de ces résultats propose un nouveau modèle d'entrée en sénescence répllicative : l'ouverture des télomères induits une faible RDA menant à un premier arrêt de prolifération transitoire p53-dépendant. Les cellules échappent à cet arrêt et se divisent, mais l'ouverture des télomères ayant causé des fusions chromosomiques, la division crée alors de nouvelles cassures doubles brins dans le génome qui déclencheront une forte RDA et un nouvel arrêt de croissance permanent, la sénescence répllicative.

**Mots-clés :** Cancer, Catastrophe mitotique, Chromatine, Instabilités génomique, RDA, Réparation de l'ADN, Sénescence Répllicative, Télomères, Télosome, Vieillesse, Tin2

## Abstract

Replicative senescence is the physiological permanent growth arrest caused by telomere shortening, at each round of replication. Once they have reach a critical length, the telomeres lose their t-loop structure, revealing the chromosome extremity that triggers a p53-dependant DNA damage response (DDR) and leads to proliferation arrest. The number of shortened telomeres that are necessary to onset senescence is not known, but accumulating evidences suggest that the cell is able to tolerate a certain level of telomere uncapping before stopping its divisions. Here, we used an inducible dominant negative form of Tin2 (Tin2DN), a member of the shelterin complex that stabilizes the t-loop, to show that telomere uncapping alone is not sufficient to induce a stable growth arrest. When expressed, Tin2DN leads to the opening of the t-loop, creating a DDR with the formation of 53BP1 DNA damage foci (DDF) and a transient growth arrest. Indeed, we observed that the cells were re-entering the cell cycle and dividing, despite their uncapped DDF harbouring telomeres. As telomere uncapping creates chromosome fusions, such division leads to the apparition of secondary DNA breaks, with an accumulation of genomic instabilities, such as chromosomes bridges or micronuclei. We observed that Tin2 DN-induced telomere uncapping leads to a very weak activation of p53 and p21, with almost no phosphorylation of Chk2. Nevertheless, when we infected our cells with a shp53, the primary growth arrest did not occur, leading to an amplification of the damages, with strong signs of instability and mitotic catastrophe. Altogether, these results propose a new model for replicative senescence: telomere uncapping induces a weak DDR that leads to a transitory growth arrest. The cells divide with fused chromosomes, creating new randomly distributed double strand breaks that trigger a stronger DDR and a permanent growth arrest. In that model, replicative senescence is not directly induced by telomere uncapping, but by an amplification of DNA damages through mitotic catastrophe.

**Keywords :** Aging, Cancer, Chromatin, DDR, DNA repair, Genomic instabilities, Mitotic catastrophe, Replicative Senescence, Shelterin complex, Telomeres, Tin2



# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	v
Liste des abréviations.....	vi
Remerciements.....	ix
INTRODUCTION .....	1
TÉLOMÈRES .....	1
Structure.....	1
Fonctions.....	5
SENESCENCE .....	20
Le phénotype sénescant .....	20
Les rôles de la sénescence.....	24
Les inducteurs de sénescences .....	29
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	32
PRÉMISSE .....	32
PROBLÉMATIQUE.....	33
OBJECTIFS .....	33
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUCTION .....	37
MATERIAL AND METHODS.....	40
RESULTS .....	43
DISCUSSION .....	49
REFERENCES .....	55
FIGURE LEGENDS:.....	59
FIGURES.....	63

<u>Figure 1:</u> Tin2 DN induced growth arrest is unstable.....	63
<u>Figure 2:</u> Proliferation with dysfunctional telomeres causes new DSBs and genomic instability.....	64
<u>Figure 3 :</u> Telomeric dysfunction induces a weak DDR.....	65
<u>Figure 4:</u> Tin2 DN-induced growth arrest is p53 dependant .....	66
<u>Figure 5:</u> Similar results are observed with an inducible shTin2.....	67
<u>Figure 6:</u> Model.....	68
<u>Figure S1:</u> Tin2DN expression induces DNA damage foci formation .....	69
DISCUSSION .....	70
PERSPECTIVES .....	76
CONCLUSION.....	78
Bibliographie.....	80

## Liste des figures

Figure 1 : Structure de l'ADN télomérique. ....	3
Figure 2 : Structure du télosome. ....	5
Figure 3 : Inhibition de la RDA par le télosome. ....	8
Figure 4 : Inhibition de la réparation par recombinaison homologue. ....	9
Figure 5 : Le raccourcissement progressif des télomères ....	14
Figure 6 : Marqueurs de la sénescence et ses effets sur l'organisme. ....	28

## Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique  
ALT: Alternative lengthening of telomere  
ATM: Ataxia telangiectasia mutated  
ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3 related  
BER: Base excision repair  
BJ-U: Lignée cellulaire de fibroblastes humains dérivée de prépuces  
CDB: Cassure double brin  
CDK: Cyclin dependant kinase  
CDKi: Cyclin dependant kinase inhibitor  
Chk2: Cell cycle checkpoint kinase  
CSB: Cassure simple brin  
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DNA SCARS: DNA segment with chromatin alterations reinforcing senescence  
Dox: Doxycycline  
EdU: 5-ethynyl-2-deoxyuridine  
E2F: E2 transcription factor  
FBS: Foetal bovine serum  
FACS: Fluorescence-activated cell sorting  
GRO: Growth related oncogene  
H2AX: Variant de l'histone H2A  
RH: Recombinaison Homologue  
IL : Interleukines  
IMR-90: Lignée cellulaire de fibroblastes humains dérivée de prépuces  
MDC1: Mediator of DNA damage checkpoint 1  
MMP: Matrix Metalloproteinases  
MRE11: Meiotic recombination 11  
MRN: Complexe composé des protéines MRE11, Rad50, NBS1

NBS1: Nijmegen breakage syndrome protein 1  
 NER: Nucleotide excision repair  
 NHEJ: Non homologous end-joining  
 PINX1: PIN2/TERF1 interacting telomerase inhibitor 1  
 PML: Promyelocytic Leukemia  
 POT1: Protection of telomere 1  
 PSAS: Phénotype sécrétoire associé à la sénescence  
 Rap1: Raf-related protein 1  
 Rb: Retinoblastoma protein  
 RDA: Réponse aux dommages à l'ADN  
 RPA : Replication protein A  
 ROS: Reactive oxygen species  
 SAHF: Senescence-associated heterochromatin foci  
 shRNA: small-hairpin RNA  
 SOD: Superoxide dismutase  
 TERC: Telomerase RNA Component  
 TERT: Telomerase reverse transcriptase  
 Tin2: TRF1/2 interacting nuclear factor 2  
 Tin2DN: Tin2 Dominant Négatif  
 TRF1/2: Telomeric repeat binding factor 1/2  
 TPP1: TINT1-PTOP-PIP1  
 TSCE: Telomeric sister chromatin exchange  
 UV: Ultraviolet  
 VEGF: Vascular endothelial growth factor  
 WRN: Werner syndrome ATP-dependent helicase  
 X-Gal: BCIG for 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside  
 53BP1: p53 binding protein 1

*L'espoir, ce n'est pas de croire que tout ira bien,  
mais de croire que les choses auront un sens ...*

*Vaclav Havel*

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens bien évidemment à remercier Francis Rodier de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir offert cette superbe opportunité en proposant son savoir, sa patience, et sa légendaire générosité. Je lui serai éternellement reconnaissante, car c'est grâce à lui que j'ai pu accomplir tout cela. Un grand merci également à Richard Bertrand, toujours disponible pour aider les étudiants et leur apporter un soutien indispensable. Merci à Julie Mantovani, qui m'a énormément aidé à mon arrivée, alors que je me sentais noyée par l'administration universitaire.

Merci à tous les membres du laboratoire, présents ou passés, qui ont chacun à leur façon, contribué à ma maîtrise. Merci à Guillaume, pilier du laboratoire dont l'absence fait trembler les murs, pour son humour acide et piquant et pour sa répartie à toute épreuve. Merci à Nicolas pour l'aide précieuse qu'il est toujours prêt à offrir dans tous les aspects de la vie de labo : manips, poster, présentations ou abstracts, tu étais vraiment sur tous les ponts ! Thanks to Shuofei for her kindness and encouragements, and for letting me babysit her wonderful kids! You were always very helpful and we were all amazed by your wonderwomaness! Merci à Mike et Maria, you guys formez le duo le plus chearfull que je connaisse, and I'm really going to miss to parler en franglais avec vous ! Merci à Marc Alexandre de prendre en héritage ce beau et complexe projet, et de m'avoir aidé lorsque j'étais dépassé par le travail, ou tout simplement quand le cœur n'y était plus. Merci à Stéphanie, Mireille, Julie, Yu, Juliette, Guila, Ophélie, Anais, Isabelle et Julie. Enfin, merci à mes 2 mousquetaires, sans qui le labo n'aurait pas eu la même saveur. Merci d'avoir été là dans les bons et les mauvais moments, merci pour votre honnêteté, votre soutien, pour tous ces moments privilégiés qu'on a pu partager. Aurélie, LLilians, je vous aime énormément.

Merci aux autres membres de l'Institut, Hubert, Laudine, Gany, Yannick, Sylvie, Macha, Prasamit... avec qui j'ai passé de bons moments, au détour d'un café ou d'un 5 à 7. Un petit mot spécial pour Déborah et Katia qui ont toujours été de bons conseils et ont apporté un soutien sans faille, ainsi que pour Patrick, aka P4, qui fût un peu le parrain de ma maîtrise, m'accompagnant à chaque étape avec une franchise légendaire et un pragmatisme unique. Tu m'as énormément appris, sur la vie de labo et sur la vie en générale ! Merci pour tout Pati Patou.

Il est indispensable d'avoir un refuge lorsque les déboires de laboratoires se font ressentir sur le moral. Ainsi, je dis merci à la musique. Merci à tous les musiciens de la PJM de m'avoir redonné l'envie de jouer et à son merveilleux chef Stéphane Forgues, Un petit mot spécial pour ma petite biche des bois fleuris Manon, ou l'incarnation des hasards de la vie. Merci pour toutes ces belles soirées musicales qui furent la définition même du bonheur !

Merci également à Balfolk Montréal avec qui j'ai eu tant de plaisir à jouer. Merci de m'avoir fait découvrir votre univers ! Merci aux sessions jam-trad de l'Escalier du lundi soir, et aux "3 capitaines" Antoine, Louis et François. Vous perpétuez votre patrimoine et partagez une incroyable chaleur humaine avec tous, même les maudits français, et ça c'est bon ! Merci à l'Abbé Molle pour les groseilles. Merci à Orange Mist et à ses interprètes, en particulier Karine et Corélia. Les filles, on est vraiment un super band et j'ai vraiment hâte de rejouer avec vous !

Merci à ma bande de Galleux : Jérôme, Jean-Noel et Thomas, vous êtes des gars en or, je vous aime mes chums ! Merci à Julia, toujours là pour nous faire rire mais aussi pour offrir une épaule où pleurer. Tu oses tout pour nous, tu es prête à donner le peu que tu as et ça, c'est une vraie preuve d'amour. Et bien évidemment, Oriane, ma jumelle tierce de poche! Qu'est-ce que je vais bien pouvoir faire sans toi, sans ta bonne humeur, ton optimisme, ta poésie, sans ta musique ! Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir aidé à poser des mots sur mes sentiments, de m'avoir comprise même quand j'avais du mal à me suivre, de m'avoir supporté et encouragé en toutes circonstances. Je t'aime énormément.

Finalement, merci à Montréal, pour tout ce qu'elle a pu m'offrir, pour m'avoir fait grandir, pour m'avoir offert de magnifiques expériences et de merveilleux souvenirs. Merci à l'hiver de m'avoir cassé 2 articulations. Merci à ma famille de m'avoir laissé partir. Merci à mon chat de me réveiller chaque matin à coup de tête. Merci au jeune homme inconnu qui m'a arrêté en pleine rue pour complimenter mes sourcils. Merci Game of Thrones. Merci à mes jurys de lire ce mémoire avec patience et indulgence. Merci Sophie de m'avoir fait aimer la recherche et la science. Merci à mon ordi d'avoir survécu malgré tout. Merci à la bouffe pour son réconfort. Merci à l'univers qui se débrouille toujours pour t'offrir ce qu'il te faut, même si ça n'est pas ce que tu veux. Merci à cette page se tourne, et à celle qui s'ouvre.

Merci.



# INTRODUCTION

## TÉLOMÈRES

C'est en 1930 que Barbara McClintock et Herman Muller, chacun sur un modèle différent, proposent que la fin des chromosomes forme une structure particulière, servant à la stabilité du génome (McClintock, 1939). C'est Muller qui choisit le terme télomère, du grec *telos* qui signifie "la fin" et *meros* qui signifie "partie". Ce sont eux qui firent les premières observations démontrant le rôle des télomères dans la stabilité du génome. Aujourd'hui, grâce à l'avancée technologique, la structure du télomère est bien connue, expliquant ainsi son rôle majeur dans le maintien de l'intégrité de la cellule.

### Structure

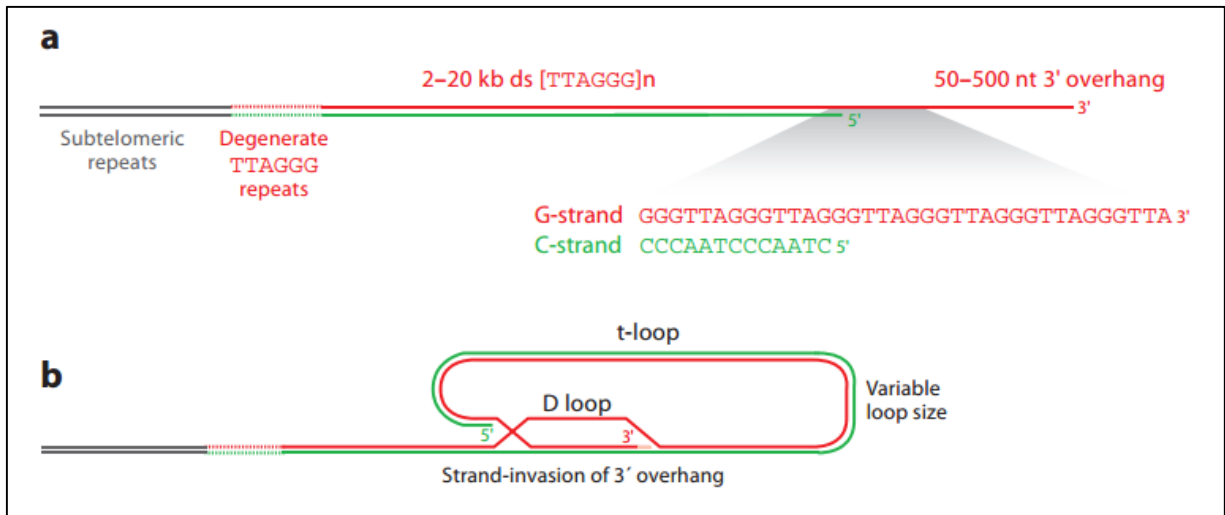
#### L'ADN télomérique

Chez l'homme, l'ADN télomérique consiste en une séquence TTAGGG répétée en tandem plusieurs centaines voire plusieurs milliers de fois (Moyzis et al., 1988). Classiquement, le brin 3' est riche en guanosine (G-strand) alors que l'autre est riche en cytosine (C-strand). Le télomère double brin se termine en son extrémité 3' par un fragment simple brin, d'une longueur variant entre 50 et 500 pb (Makarov et al., 1997). Son origine n'est pas certaine, mais on pense qu'elle est due à une résection. De façon surprenante, si la fin du brin 3' n'est pas définie, le brin 5' termine quasi-systématiquement par la séquence "ATC" (Sfeir et al., 2005).

La longueur du télomère varie énormément au sein des mammifères : chez l'homme elle est comprise entre 10 et 20kb (de Lange et al., 1990), alors qu'elle peut dépasser les 50kb chez

la souris (Kipling and Cooke, 1990). On retrouve également une grande variabilité au sein d'un même organisme, selon le potentiel réplicatif d'une cellule, ou l'exposition au stress d'un tissu. Finalement, on observe une hétérogénéité au sein même d'un noyau qui est conservée entre les cellules. Par exemple, les chromosomes 4q, 1p, 3p et 5p sont connus pour avoir des télomères plus longs que la moyenne, alors que les chromosomes 17p, 22q, 19p, et 20q ont des télomères plus courts que la moyenne (Martens et al., 1998). Pourtant, la taille d'un télomère est critique pour conserver sa structure.

En effet, des études en microscopie électroniques ont permis de révéler que le télomère adoptait une forme de boucle, appelée "T-loop" (Griffith et al., 1999). Elle est formée par l'invasion du télomère double brin par le 3' simple brin. La liaison est assurée par la complémentarité entre le 3' simple brin et le 5' double brin alors que le 3' double brin est déplacé dans une autre boucle, la "D-loop". La taille de la boucle est également très variable selon les espèces mais dépend fortement de la taille du télomère. Ainsi, si le brin d'ADN est trop court, la T-loop ne pourra pas se former. Son rôle est pourtant primordial car en séquestrant l'extrémité du chromosome, elle le protège du système de réparation des dommages à l'ADN (*voir section "DNA SCARS et RDA persistante"*). Par ailleurs, la boucle ne pourrait pas assurer cette fonction sans être stabilisée par la chromatine télomérique.



**Figure 1 : Structure de l'ADN télomérique.**

(a) Le chromosome se termine par un nombre variable de répétitions de la séquence TTAGGG. Le télomère contient une extension du brin G 50 à 500 pb. La séquence en 3' n'est pas définie alors que celle en 5' est conservée en un ATC-5'. (b) Structure de la t-loop formée par télomère. Par W.Palm et T. de Lange, *Annu Rev Genet* 2008 – Autorisation d'utiliser cette figure obtenue.

### Le télosome

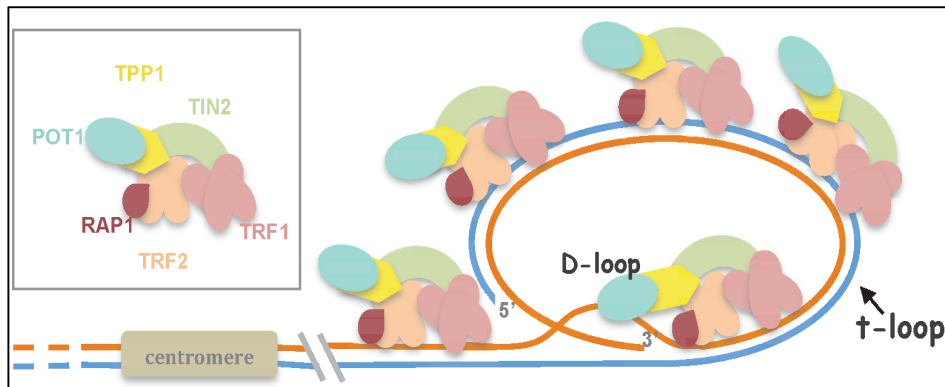
En plus des histones formant les nucléosomes communs à l'ensemble du génome, les télomères sont associés à un complexe protéique formé de 6 sous-unités : le télosome (Lange, 2005). Les 6 composants du télosome sont présents spécifiquement et en tout temps au niveau des télomères. Ensemble, ils permettent de stabiliser la boucle télomérique en assurant la liaison entre ADN simple brin et double brin (Liu et al., 2004).

- TRF1 et TRF2 : Telomere repeat factor 1 et 2 sont les protéines liant directement l'ADN télomérique via leur domaine TFRH, avec TRF1 liant l'ADN double brin et TRF2 la

jonction simple brin-double brin (Bianchi et al., 1997; Broccoli et al., 1997). En plus de leur rôle structural, elles sont impliquées dans différentes voies moléculaires associées aux télomères : TRF1 va limiter l'action de la télomérase (*voir ci-dessous*) via le recrutement de PINX1 (Zhou and Lu, 2001) et TRF2 va empêcher l'activation de la voie de RDA au niveau du télomère (van Steensel et al., 1998) (*voir section ‘Inhibition de la RDA’*). Enfin, ces 2 protéines participent, après leur sumoylation, au recrutement des PML lors de l'allongement des télomères par ALT (alternative lengthening of telomeres, *détaillé plus bas*) (Potts and Yu, 2007).

- POT1 : Protection of telomere 1 se lie à l'ADN simple brin et offre ainsi une protection primordiale de l'extrémité chromosomique. Il la protège de la dégradation par des nucléases et grâce à sa liaison avec TRF2, inhibe l'activation de la RDA (Hockemeyer et al., 2005; Kendellen et al., 2009).
- Rap1 : Repressor/activator protein 1 est sans conteste la protéine la moins caractérisée du télosome. Incapable de lier l'ADN, elle se lie constitutivement à TRF2 et est indispensable à son recrutement au télomère et donc, à sa fonction d'inhibiteur de la RDA (Sarthy et al., 2009).
- TPP1 : TINT1, PTPN1, PIP1 est également une protéine support ne liant pas l'ADN. Elle forme un hétérodimère avec POT1 pour favoriser sa liaison à l'ADN. De plus, l'hétérodimère semble jouer sur l'activité de la télomérase en modulant son accès à l'ADN télomérique (Xin et al., 2007; Wang et al., 2007).
- Tin2 : TRF1- and TRF2-Interacting Nuclear Protein 2 est un composant central du télosome. Il lie à la fois les hétérodimères TRF1-TRF2 et POT1-TPP1 (Ye et al., 2004),

formant ainsi un pont entre les protéines liant l'ADN double brin et celles liant l'ADN simple brin (Kim et al., 2004, 2008). Sa position centrale lui confère donc un rôle majeur dans le maintien de la stabilité du télosome.



**Figure 2 : Structure du télosome.**

Le télosome est composé de six sous unités : TRF1 et TRF2 qui se lient à l'ADN double brin, qui fait le pont entre les deux, Rap1 se lie à TRF2, POT1 se lie à l'ADN simple brin et TPP1 à POT1. Par E. Boutou et al., *Biochemistry Genetics and Molecular Biology New research directions in DNA repair 2013* – Autorisation d'utiliser cette figure obtenue.

## Fonctions

### Protection du génome

La fonction primaire du télomère est de protéger l'extrémité de l'ADN afin de maintenir l'intégrité chromosomique. Cette protection se fait de deux façons: en empêchant la dégradation de l'ADN et en inhibant sa détection par le système de détection et réparation des dommages.

Tout d'abord, la structure même du télomère permet la protection de la fin du chromosome : la boucle formée protège l'extrémité 3' en son sein, la rendant inaccessible aux

nucléases qui pourraient la dégrader. De récentes évidences suggèrent que cette protection pourrait également venir des membres du télosome : il serait impliqué dans la régulation de la résection de l'extrémité chromosomique, expliquant la conservation de la séquence "ATC" en 5' du brin d'ADN décrite plus tôt. En effet, celle-ci est perdue suite à l'abolition de l'expression du gène POT1, résultant en une fin aléatoire du C-strand (Hockemeyer et al., 2005). Les mécanismes régulant cette spécificité ne sont pas encore connus, mais on suppose que POT1 va activement inhiber l'activité nucléolytique au niveau de la séquence ATC.

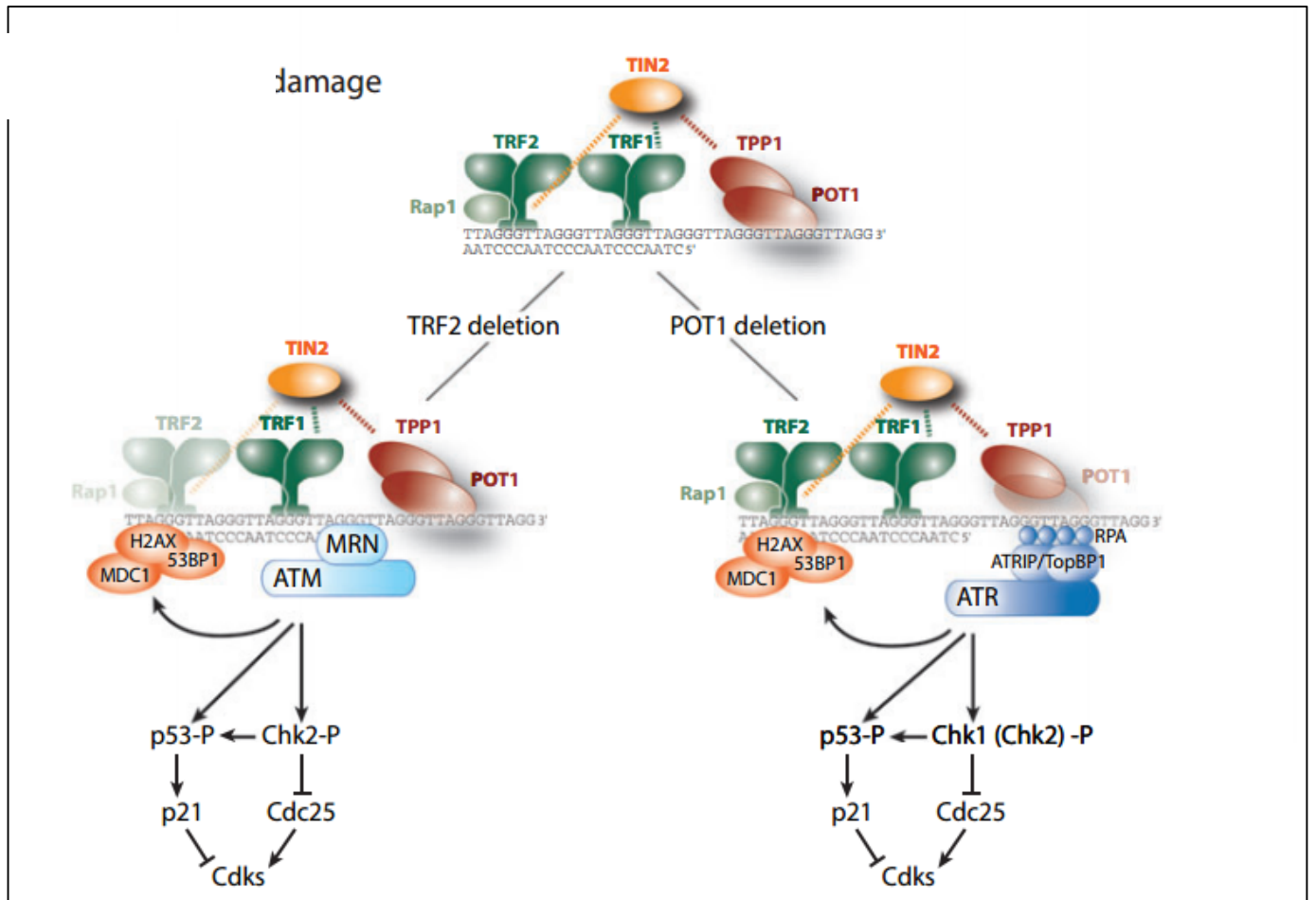
L'autre danger pesant sur les télomères est leur reconnaissance par la cellule comme dommages à l'ADN. En effet, l'extrémité chromosomique peut être assimilée comme une cassure dans la double hélice. La cellule va alors déclencher un programme de réparation (d'Adda di Fagagna et al., 2003) pouvant résulter en des fusions chromosomiques aberrantes qui seraient alors la source d'importantes instabilités génomiques (van Steensel et al., 1998). Cette réaction étant incompatible avec la prolifération normale des cellules, l'inhibition des voies de reconnaissances et de réparation des dommages à l'ADN est cruciale pour le maintien de l'intégrité du génome. Une fois encore, la forme même de la boucle télomérique protège l'extrémité chromosomique en la rendant inaccessible. Ainsi, la déstructuration de la chromatine télomérique par l'abrogation d'une des protéines du télosome va révéler l'extrémité chromosomique et déclencher une réponse aux dommages à l'ADN (RDA *détaillée dans la section "DNA SCARS et RDA persistante"*). Mais les membres du télosome jouent également un rôle actif dans cette inhibition. En effet, des études supprimant indépendamment les différents composants du télosome ont permis d'établir leur rôle spécifique dans l'inhibition de la RDA et des voies de réparation des dommages à l'ADN.

### Inhibition de la RDA

La structure même du télomère camoufle l'extrémité libre, empêchant naturellement sa reconnaissance par la cellule. Mais l'inhibition de la RDA au niveau du télomère se fait également activement via la répression des kinases ATM et ATR (Denchi and de Lange, 2007). Elles sont responsables de la transduction du signal de RDA vers les protéines effectrices de cascade. Elles ont chacune leur spécificité, ATM étant activée suite à une cassure double brin tandis que ATR va l'être suite à une cassure simple brin. Ainsi, en inhibant la fonction de TRF2 par l'usage d'un sh ou d'un dominant négatif, on induit une forte activation d'ATM ainsi que de ces cibles en aval (Karlseder et al., 1999). On a alors formation de foyers de dommages télomériques et stabilisation de p53 qui va activer les différents checkpoints du cycle cellulaire. De façon intéressante, cette RDA induite par la perte de TRF2 est absente si ATM est absent (Denchi and de Lange, 2007). Néanmoins, les mécanismes par lesquels TRF2 bloque l'activation d'ATM ne sont pas encore clairement élucidés.

De façon similaire, l'inactivation par un dominant négatif ou un sh de la protéine POT1 va déclencher une RDA ATR-dépendante, avec formation de foyers et arrêt du cycle cellulaire (Denchi and de Lange, 2007). Le rôle inhibiteur de POT1 dépend fortement de son association avec TPP1. En effet, l'utilisation d'un mutant de POT1 ayant perdu sa capacité de liaison à TPP1 empêche la formation du dimère limite la capacité de POT1 à inhiber ATR (Hockemeyer et al., 2007). Une des hypothèses suggère que l'hétérodimère prévient la liaison de RPA (replication protein A) au simple brin télomérique (Denchi and de Lange, 2007).

Cette protection active est particulièrement importante lors de la phase S de réplication de l'ADN, où l'ouverture de la boucle télomérique est nécessaire à la duplication de la séquence télomérique. L'état déprotégé de l'extrémité chromosomique étant inévitable, ce mode actif de protection est indispensable.



**Figure 3 : Inhibition de la RDA par le télosome.**

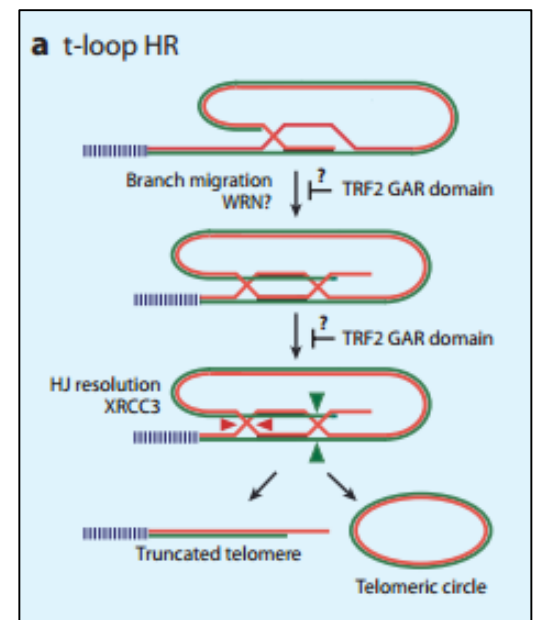
Les protéines du télosome TRF2 et POT1 empêchent l'activation des kinases apicale de la RDA, respectivement ATM et ATR, responsables de la phosphorylation des kinases Chk2 et Chk1 suite à un bris double brin ou simple brin (respectivement). L'activation de Chk2 et Chk1 va leur permettre d'activer p53 par phosphorylation, menant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire. *Par W.Palm et T. de Lange, Annu Rev Genet 2008 – Autorisation d'utiliser cette figure obtenue.*



## Inhibition de la réparation par recombinaison homologue

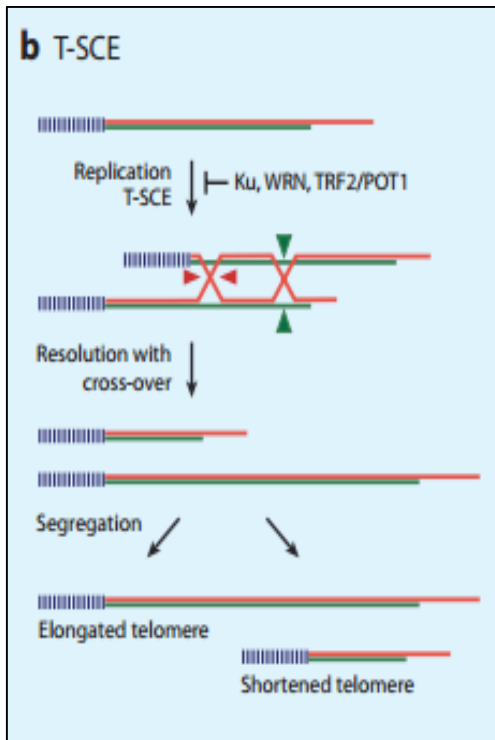
La recombinaison homologue (HR) est une voie de réparation des cassures double brins qui utilise le brin complémentaire comme modèle, offrant ainsi une réparation fiable et sans erreur. Trois modes de recombinaison homologue ont été observés au niveau des télomères : La t-loop HR, la TSCE pour Telomere Sister Chromatin Exchange et celle avec les sites interstitiels (Lange, 2005).

- La t-loop HR se produit au sein même de la boucle télomérique et se caractérise par une migration de l'extrémité du chromosome dans la D-loop. La boucle va se circulariser et être excisée par XRCC3. Bien que les détails mécanistiques n'aient pas encore été élucidés, l'ADN télomérique circulaire caractéristique a été observé dans des cellules exprimant une protéine TRF2 tronquée, suggérant son implication dans l'inhibition du HR (Wang et al., 2004).



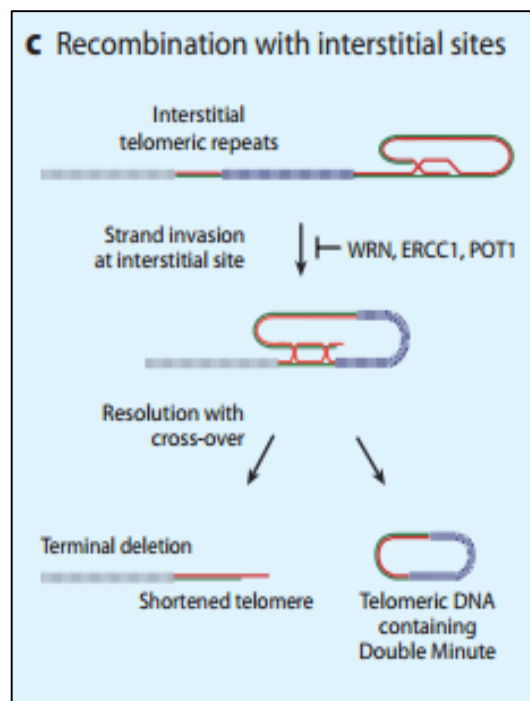
**Figure 4 : Inhibition de la réparation par recombinaison homologue.**

Le télomère inhibe les trois voies de réparations par recombinaison homologue (HR) : (a) Le t-loop HR (b) La TSCE (c) La recombinaison par les sites interstitiels. *Par W.Palm et T. de Lange, Annu Rev Genet 2008 – Autorisation d'utiliser cette figure obtenue.*



- La TSCE, soit la recombinaison télomérique entre chromatides sœurs peut avoir lieu après la réplication de l'ADN. L'un des bras va envahir l'autre pour former la jonction de Holliday qui va se résoudre par un cross over inter chromosomique. Finalement, l'un des télomères va se rallonger au détriment de l'autre, créant ultimement deux cellules filles aux capacités prolifératives très différentes. Une fois encore, TRF2 semble, avec POT1 jouer un rôle important dans l'inhibition de la TSCE, bien que d'autres acteurs protéiques semblent participer (Celli et al., 2006).

- La recombinaison avec des sites interstitiels correspond à celle ayant lieu entre un télomère et une séquence TTAGGG intra-génomique. Cela entrainera la formation d'ADN double minute (fragment circulaire d'ADN extra-chromosomique) qui contiendra une partie du télomère. Ces TDM (telomeric double minute chromosomes) ont été observés suite à une déplétion de POT1, révélant son implication dans l'inhibition de cette recombinaison (Wu et al., 2006; He et al., 2006).



#### Inhibition de la réparation par fusion non-homologue (NHEJ)

Contrairement au HR, le NHEJ est un mode de réparation peu fidèle qui va simplement lier les 2 extrémités chromosomiques, en ignorant le risque d'erreur et donc de mutations. Comme aucune matrice n'est nécessaire, elle peut avoir lieu à n'importe quelle étape du cycle cellulaire et promeut la survie cellulaire. Il devient alors évident que cela peut devenir un problème dans le cas des télomères, qui risquent alors de fusionner entre eux de façon anarchique, causant des aberrations chromosomiques graves. Une fois encore, c'est TRF2 qui est en charge d'empêcher le NHEJ, mais son mécanisme d'action n'est pas encore entièrement élucidé. De nombreuses études utilisant des mutants de TRF2 ou des sh ont observé des signes de fusions inter-chromosomiques dépendant de la Ligase IV, qui est celle qui permet la terminaison du NHEJ (Smogorzewska et al., 2002). De façon assez surprenante, la déplétion de

POT1 cause également des fusions télomériques, lui suggérant un rôle dans l'inhibition du NHEJ (Hockemeyer et al., 2005; Veldman et al., 2004; Bae and Baumann, 2007).

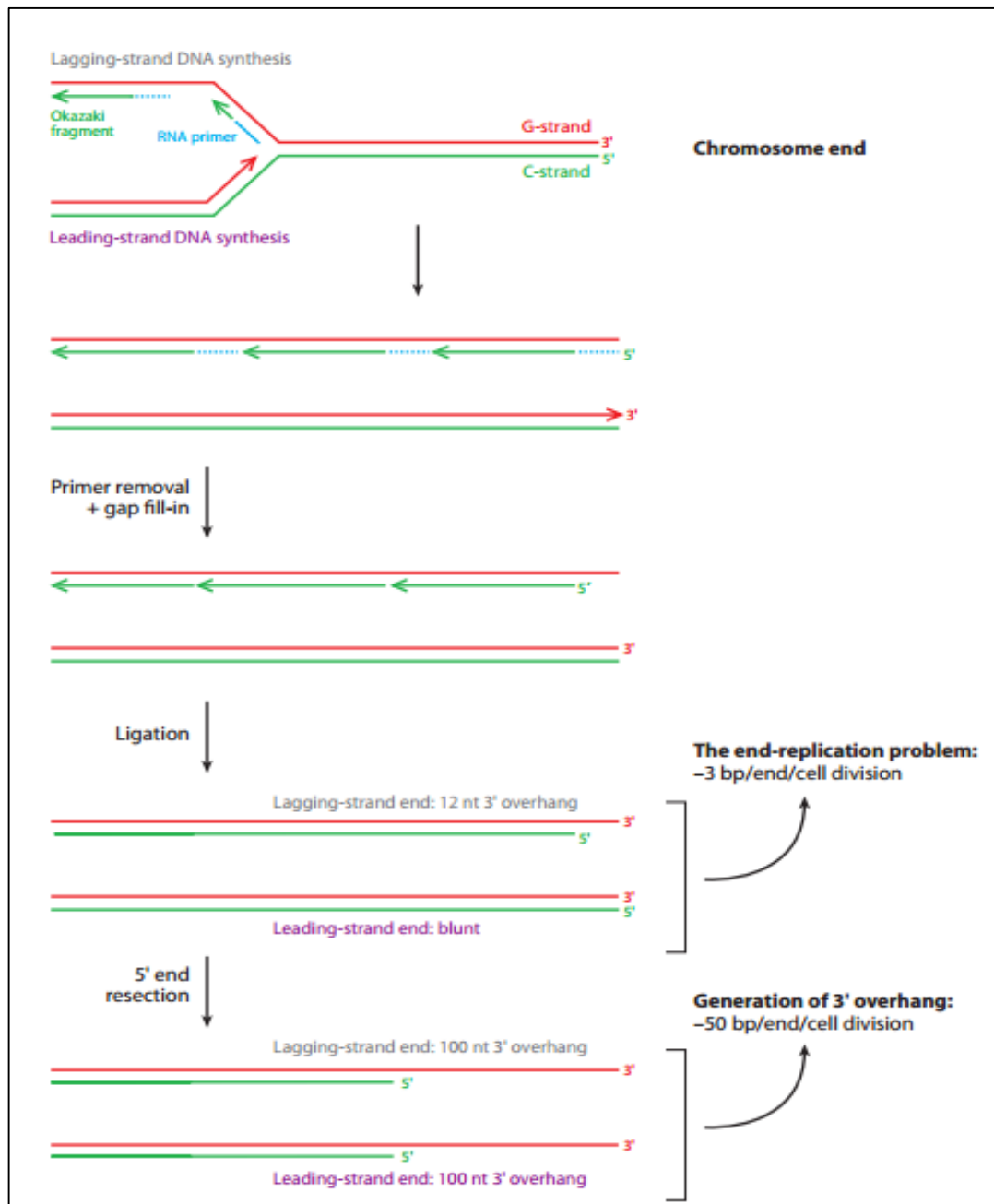
Les télomères jouent donc un rôle crucial dans la protection de l'intégrité du génome, en protégeant l'extrémité des chromosomes du système de reconnaissance et de réparation des dommages à l'ADN, évitant ainsi les fusions inter-chromosomiques. En cas de dysfonction télomérique, le brin d'ADN va être révélé et reconnu par la cellule comme une cassure devant être réparée, bloquant ainsi la prolifération cellulaire. Dans les modèles artificiels, la modification de la chromatine se fait en inactivant ou en supprimant un membre du télosome, mais naturellement, le télomère est, comme le reste du génome, sujet au stress externes et peut subir des dommages importants. Un de ces stress, le stress réplicatif, est la cause du raccourcissement physiologique des télomères et leur confère ainsi leur rôle d'horloge biologique cellulaire.

### L'horloge biologique

De par leur nature, les télomères sont le reflet de l'âge prolifératif de la cellule. En effet, la longueur des télomères délimite le potentiel prolifératif des cellules, c'est ce qu'on appelle le « end replication problem » (Levy et al., 1992).

La réplication est le processus par lequel l'ADN va être dupliqué, afin d'être partagé de façon égale entre les deux cellules filles après la mitose. Chaque brin d'ADN va servir de matrice et la double hélice va s'ouvrir pour former une fourche de réplication. L'ADN polymérase va alors ajouter des nucléotides sur une amorce ARN, c'est la phase d'élongation. Le problème est que l'ADN polymérase n'est capable de synthétiser que dans un seul sens : de

5' vers 3'. Ainsi, sur un des deux brins d'ADN, le brin direct, l'enzyme va se fixer en 5' et synthétiser le nouveau brin sans interruption, c'est la réplication continue. En revanche, sur le brin complémentaire, dit brin retardé, la synthèse ne peut pas se faire directement puisque le brin est orienté de 3' vers 5'. Ainsi, l'ADN polymérase va synthétiser des amorces chimères, constituées en parties d'ARN et en partie d'ADN : les fragments d'Okazaki. La partie ARN de ces fragments va finalement être dégradée et remplacée par de l'ADN, à l'exception de l'extrémité 3' du télomère pour laquelle la polymérase n'aura pas d'amorces. Ainsi, à chaque division les télomères raccourcissent progressivement, jusqu'à devenir trop courts pour former la t-loop et assurer leur fonction de protecteur du génome. La cellule va alors cesser de proliférer et entrer en sénescence (*voir section "Sénescence"*). La longueur des télomères témoigne ainsi de l'âge d'une cellule et de son potentiel prolifératif restant.



**Figure 5 : Le raccourcissement progressif des télomères**

À chaque réplication, le télomère est reséqué d'un nombre variable de paires de bases causant son raccourcissement progressif à chaque division. Par W.Palm et T. de Lange, *Annu Rev Genet* 2008 – Autorisation d'utiliser cette figure obtenue.

Cependant, certains types cellulaires ont trouvé un moyen de contourner cette limite proliférative et se sont immortalisés en développant des mécanismes permettant l'allongement de leurs télomères.

### Télomérase

La télomérase est une enzyme de type ribonucléoprotéique permettant d'ajouter des répétitions TTAGGG à l'extrémité du télomère. Cette reverse transcriptase se compose de deux sous-unités : la sous-unité ARN ou TERC (Telomerase RNA component) (Feng et al., 1995), qui sert de matrice à la synthèse de la répétition télomérique et la sous-unité protéique ou TERT (Telomerase reverse transcriptase), qui possède une activité transcriptase inverse et qui assure la synthèse de la séquence télomérique à partir de l'autre sous-unité ARN (Harrington et al., 1997; Nakamura et al., 1997). Elle est principalement exprimée dans les cellules souches, mais également dans une grande partie des cellules cancéreuses (Meyerson et al., 1997), pour qui sa réactivation présente un avantage sélectif majeur.

Son activité est finement régulée par les protéines du télosome : TRF1 est indispensable pour limiter la liaison de la télomérase sur le télomère via PINX1 (Zhou and Lu, 2001), Tin2 va aider à son recrutement sur le télomère (Frank et al., 2015) et POT1 se liant directement à l'ADN simple brin et donc, au substrat de la télomérase va atténuer son activité (Wang et al., 2007). De façon surprenante, d'autres études ont montré que le dimère POT1-TPP1 permettait d'améliorer la processivité de l'enzyme (Zaug et al., 2010; Wang and Lei, 2011).

## ALT

Une minorité de cellules cancéreuses n'exprimant pas la télomérase a développé une voie d'élongation indépendante : le ALT (alternative lengthening of telomeres) (Bryan et al., 1995; Neumann and Reddel, 2002). Les cellules utilisent la voie du HR pour rallonger leur télomère indépendamment de la télomérase. Ce phénomène a été découvert récemment, il n'existe donc pas de test permettant de le détecter, mais on peut déduire sa présence en cherchant dans la cellule certaines caractéristiques. Des télomères très longs malgré l'absence de télomérase, une grande hétérogénéité dans leur longueur entre les chromosomes (Bryan et al., 1995) et également des brusques événements de raccourcissement-élongation, probablement via TSCE (Londoño-Vallejo et al., 2004). On peut également les reconnaître par la présence de c-circles spécifiques, (CCCTAA)<sub>n</sub>, partiellement simple brin qui sont le produit de la HR (Henson et al., 2009). Ces fragments d'ADN télomériques circulaires peuvent même être détectés dans le sang des patients atteints d'ostéosarcomes ALT(+). Finalement, un des principaux marqueurs est la présence de PML-NB (promyelocytic leukemia nuclear bodies) (Yeager et al., 1999), une structure nucléaire également retrouvée dans les dommages à l'ADN persistants (*voir DNA SCARS*).

Le maintien de la structure des télomères est donc indispensable à la survie et à la prolifération cellulaire. Comme discuté plus haut, le raccourcissement progressif des télomères à chaque division et la dysfonction télomérique associée entraîne un arrêt de croissance lié au vieillissement normal. Mais d'autres syndromes associés aux télomères ont été identifiés,



démontrant leur rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire (Garcia et al., 2007; Carroll and Ly, 2009).

#### Maladies associées à une dysfonction télomérique

- **Cancer** : Le lien entre télomère et cancer est si étroit, que l'immortalisation cellulaire par la réexpression de la télomérase est considérée comme un marqueur du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011). En effet, celle-ci est réactivée dans plus de 90% des cancers (Kim et al., 1994; Shay and Roninson, 2004), permettant aux cellules cancéreuses de proliférer de façon anarchique et ce, malgré d'importants dommages. Par ailleurs, comme déjà évoqué plus tôt, une dysfonction télomérique (par exemple une ouverture de la t-loop) va causer des fusions chromosomiques, des cassures et autres instabilités génomiques, signes avant-coureurs de carcinogénèse (Artandi and DePinho, 2000; Maser and DePinho, 2002).
- **Les Syndromes Progéroïdes**, ou syndromes de vieillissement accéléré, sont des maladies aux caractéristiques et origines variées (Hofer et al., 2005). Par exemple, l'ataxia telangectasia est une maladie autosomale récessive causée par une mutation dans le gène codant pour la kinase ATM. Elle est associée à un raccourcissement des télomères accéléré, des anomalies dans la réplication télomérique, se traduisant par une prédisposition à développer des cancers à un jeune âge, particulièrement des lymphomes et des leucémies (Shiloh, 1997; Hofer et al., 2005). De la même façon, le ''Nijmegen Breakage Syndrome'' (NBS) est causé par une mutation du gène codant pour la protéine NBS1, une cible d'ATM, et se traduit par un phénotype similaire (Shiloh, 1997; Hofer

et al., 2005). Le syndrome de Werner lui est causé par une mutation dans le gène RECQ3/WRN qui code pour l'hélicase/exonucléase WRN (Hofer et al., 2005). Il est également associé à un raccourcissement des télomères, mais également aux ostéosarcomes. Autre exemple, le syndrome Hutchinson Gilford est causé par une dysfonction de la lamine A, une protéine structurale nucléaire semblant avoir un effet direct sur la longueur des télomères (Decker et al., 2009).

- **Déficit en télomérase.** En effet, si la réactivation de la télomérase est associée au cancer, un défaut de son expression dans certains tissus va causer différentes pathologies. Parmi elles, la dyskératose congénitale, causée par une mutation du gène de la dyskérine. Ce gène code pour une protéine nucléolaire impliquée dans les modifications des ARN ribosomiaux, ainsi que de la sous unité TERC de la télomérase (Heiss et al., 1998; Mitchell et al., 1999). Ce syndrome lié à l’X est caractérisé par une dépigmentation de la peau, de l’ostéoporose et d’autres déficits de la moelle osseuse. Ce syndrome peut également être causé par une mutation directe de la sous unité TERC (Hofer et al., 2005), ou encore par la présence de formes mutées de TPP1 et Tin2 (Savage et al., 2008; Walne et al., 2008; Frank et al., 2015). De façon intéressante les mutations de Tin2 sont principalement des faux-sens, localisées dans la région C-terminale hors de la zone de liaison avec le télosome (Canudas et al., 2011; Frank et al., 2015). On trouve également la fibrose pulmonaire idiopathique, une maladie infantile mortelle autosomale dominante, caractérisée par des cicatrices pulmonaires et de mauvais échanges gazeux (Gross and Hunninghake, 2001). Elle a été associée à différentes mutations dans les domaines TERT et TERC de la télomérase, résultant en des télomères anormalement

courts dans les lymphocytes (Tsakiri et al., 2007; Armanios et al., 2007). Les mutations dans le gène de la télomérase sont aussi responsables d'un grand nombre de troubles sanguins, comme la leucémie aigue myéloblastique, causant une prédisposition au cancer (Estey and Döhner, 2006), la thrombocytémie essentielle, caractérisée par une surproduction de plaquettes (Schafer, 2006), ou encore l'anémie aplasique, qui peut provenir d'une dysfonction dans la partie TERC (Carroll and Ly, 2009), mais aussi d'une des protéines du télosome (Savage et al., 2006; Walne et al., 2008).

# SÉNESCENCE

La sénescence cellulaire fût décrite pour la première fois en 1961 par Hayflick et Moorhead qui observèrent que leurs cultures de fibroblastes cessaient de proliférer après un certain nombre de passages et que cela s'accompagnaient de changements dans la morphologie des cellules (Hayflick and Moorhead, 1961). Bien qu'ils n'aient effectué aucune étude moléculaire avancée, ils ont tout de même supposé que cet arrêt de croissance était lié au vieillissement de l'organisme et que seules les cellules immortalisées pouvaient en échapper. Ces postulats purement hypothétiques se sont avérés tout à fait corrects et aujourd'hui, le phénotype sénescence ainsi que son rôle dans l'organisme sont très bien décrits et ont révélé toute leur complexité.

## Le phénotype sénescence

La sénescence est un phénomène complexe à décrire car il n'existe pas à ce jour de marqueur qui lui soit spécifique. En effet, il existe tout un ensemble de caractéristiques variées permettant de conclure sur le statut sénescence d'une cellule.

### Arrêt de croissance et expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire

L'arrêt de prolifération est la première et principale caractéristique de la sénescence, même si elle n'est pas spécifique puisqu'on la retrouve également dans les cellules en quiescences (Blagosklonny, 2012). On peut mesurer la prolifération en analysant la courbe de croissance de cellules en culture, mais aussi en utilisant un marquage à l'EdU (5éthynyl-2deoxyuridine) (Buck et al., 2008). Ajouté au milieu de culture, cet analogue de la thymidine

s'incorpore à l'ADN en cours de synthèse lors de la phase S de réplication. Après révélation de la fluorescence, on peut déterminer la proportion de cellules étant EdU positives, c'est-à-dire ayant incorporé la molécule et donc, étant encore active dans le cycle cellulaire, en prolifération. L'arrêt de croissance est également caractérisé par l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire (Rodier and Campisi, 2011). Parmi eux, p53 est un facteur de transcription ayant un rôle de régulateur négatif majeur de l'avancée dans le cycle cellulaire. Il va notamment induire la transcription d'inhibiteurs de CDK (cyclin-dependant kinases) (CDKi) tels que p21, mais aussi celle d'inducteurs d'apoptose comme Bax et n'est donc pas spécifique à la sénescence. D'autres gènes impliqués dans l'inhibition du cycle cellulaire vont également être activés, comme p16 et Rb (*voir section "remodelage de la chromatine"*). Tous ces facteurs servent de biomarqueurs à l'arrêt de croissance, même si ce dernier n'est pas forcément associé à la sénescence.

### Remodelage de la chromatine

Comme décrit plus haut, la sénescence est caractérisée par une expression maintenue de p16, un inhibiteur du complexe cycline D-cdk4/6 qui agit sur le point de contrôle d'entrée en phase S. Le complexe phosphoryle Rb libérant ainsi le facteur de transcription E2F, qui peut alors activer la transcription des gènes d'entrée en phase S. En cas d'activation de p16, le complexe cyclineD-Cdk4/6 ne peut plus phosphoryler Rb qui va séquestrer E2F au niveau des promoteurs des gènes contrôlant l'entrée en phase de réplication. On observe alors la formation de foyers d'hétérochromatine, les SAHF, (senescence-associated heterochromatin foci) (Narita et al., 2003) qui rendent ces promoteurs inaccessibles à la polymérase. Ces zones d'ADN condensées sont très facilement visibles au microscope à fluorescence, par un simple marquage

au DAPI, une molécule fluorescente (450-490nm) qui se lie aux bases adénine et thymine de l'ADN.

### Changement morphologiques

Dès leurs premières observations, Hayflick et Moorhead notèrent une nette modification de la morphologie de cellules sénescents (Hayflick and Moorhead, 1961). En effet, celles-ci s'aplatissent et s'élargissent, et les noyaux semblent aussi se gonfler. Les mécanismes reliés à ces changements se sont pas encore connus, mais semblent impliquer les fibres de stress d'actine ou encore la redistribution de protéines néo-synthétisées (Chen et al., 2000).

### Activité $\beta$ -Galactosidase

Cette enzyme lysosomale sert à l'hydrolyse des  $\beta$ -Galactosides en monosaccharides et est accumulée dans les cellules sénescents, dont la masse lysosomale est augmentée (Lee et al., 2006). Ainsi, placées à pH 6, les cellules sénescents vont être capables de dégrader le X-Gal, un substrat chromogénique qui va libérer un colorant bleu dans les lysosomes des cellules sénescents (Dimri et al., 1995). Cependant, aucun rôle fonctionnel de mise en place ou de maintien n'a été identifié pour cette enzyme (Lee et al., 2006).

### DNA SCARS et RDA persistante

Suite à une cassure de type double brin, la cellule va mettre en place toute une cascade de réaction afin d'arrêter temporairement sa prolifération et tenter de réparer ses dommages.

Cette cascade de réaction s'appelle la réponse aux dommages à l'ADN (RDA) (Zhou and Elledge, 2000). Elle consiste au recrutement et à l'activation de nombreux facteurs au niveau du site de cassures pour former ce qu'on appelle un foyer de dommages à l'ADN ou foci. Parmi ces facteurs, le complexe MRN, composés des protéines MRE11, Rad50 et NBS1, va permettre la détection de la cassure et le recrutement de la kinase apicale ATM. Celle-ci va alors phosphoryler un grand nombre de cibles, telles que le variant d'histone H2AX ( $\gamma$ H2AX), son ligand MDC1, 53BP1 ou encore Chk2. Ce dernier va alors activer p53 qui, via p21, va bloquer l'avancée dans le cycle cellulaire en activant les checkpoints du cycle cellulaire. Si les dommages sont réparés, les foyers, qualifiés alors de transitoires, vont être résolus et la cellule va reprendre sa prolifération. En revanche, si les dommages sont trop importants, les foyers vont persister et évoluer en DNA SCARS (DNA segments with chromatin alteration reinforcing senescence) (Rodier et al., 2011). Ceux-ci sont plus gros, co-localisent avec les PML nuclear bodies et permettent de renforcer l'arrêt de croissance ainsi que le phénotype sécrétoire (Rodier et al., 2009, 2011). Une fois encore, ce biomarqueur ne suffit pas à conclure quant à la sénescence d'une cellule, puisque les DNA SCARS n'apparaissent qu'en cas de sénescence induite par les cassures à l'ADN. (*voir section 'inducteurs de sénescence'*).

#### Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence

Le sécrétome sénescence, ou PSAS, correspond à l'ensemble des facteurs sécrétés par les cellules sénescence. Intiment liée aux foci et à NF- $\kappa$ B, la composition du PSAS est très variable selon l'inducteur de la sénescence, le passé génétique de la cellule ou encore son micro-environnement. Il peut notamment être composé d'interleukines (IL-6, IL-8) (Rodier et al.,

2011), de protéases (MMP-1) (Hornebeck and Maquart, 2003) ou encore de facteurs non solubles comme la fibronectine (Coppé et al., 2010). Une fois encore, ce marqueur n'est pas spécifique puisque ce type de sécrétion se retrouve dans beaucoup de phénomènes biologiques. Si certains facteurs sont abondamment exprimés par les cellules sénescents et donc, communément utilisés comme marqueurs, aucun ne lui est exclusif.

## **Les rôles de la sénescence**

Initialement associée au vieillissement cellulaire, la sénescence a été le sujet de nombreuses études qui ont révélé tout sa complexité. Aujourd'hui, il est clair que la sénescence est un phénomène physiologique qui est impliquée dans de nombreux processus au cours de la vie d'un organisme (Rodier and Campisi, 2011).

### La sénescence lors du développement embryonnaire

Depuis sa découverte, la sénescence a toujours été caractérisée comme une réponse associée au stress. Néanmoins, plusieurs études ont démontré la présence de cellules sénescents dans des contextes physiologiques, notamment lors du développement embryonnaire. La sénescence a été observée dans le toit de la plaque neurale, ainsi que sur la crête apicale, deux zones majeures de signalisation embryonnaire (Storer et al., 2013). Une autre étude a montré des cellules sénescents au sein du mésonéphros et dans le sac endolymphatique (Muñoz-Espín et al., 2013). Ces deux études indépendantes ont démontré que la perte de la sénescence dans les embryons entraînait des défauts de formation et de remodelage tissulaire. De façon



intéressante, les cellules sénescents semblent être destinées à disparaître par apoptose ou clairance par les macrophages.

### Insulte tissulaire et réparation

Cette fonction de la sénescence vient de son phénotype sécrétoire. En effet, le PSAS comporte de nombreux facteurs impliqués dans la réparation cellulaire : des facteurs de croissance, des protéases, ou encore des attractants des cellules immunitaires. Ainsi, lors d'une blessure tissulaire, on retrouve une forte accumulation de cellules sénescents qui vont ainsi permettre le recrutement des cellules de l'immunité afin de prévenir une infection au site de la blessure (Jun and Lau, 2010). De plus, un modèle de souris a démontré le rôle de la sénescence dans la résolution de la fibrose hépatique : suite à un dommage au niveau du foie, les cellules stellaires vont sécréter une importante quantité de matrice extracellulaire qui va causer une cicatrice fibrotique. Cependant, les cellules stellaires vont entrer en sénescence et les MMP sécrétées par le PSAS vont permettre la dégradation de la matrice extracellulaire fibrotique, empêchant la formation d'une cicatrice fibrotique (Krizhanovsky et al., 2008).

### La sénescence suppressive de tumeur

De par sa caractéristique première, l'arrêt de croissance, le rôle anti-cancéreux de la sénescence semble évident. En effet, elle va empêcher la prolifération anarchique des cellules endommagées, cause initiale du développement tumoral (Cosme-Blanco et al., 2007; Feldser and Greider, 2007; Serrano, 2007). La sénescence a été retrouvée dans des lésions pré-

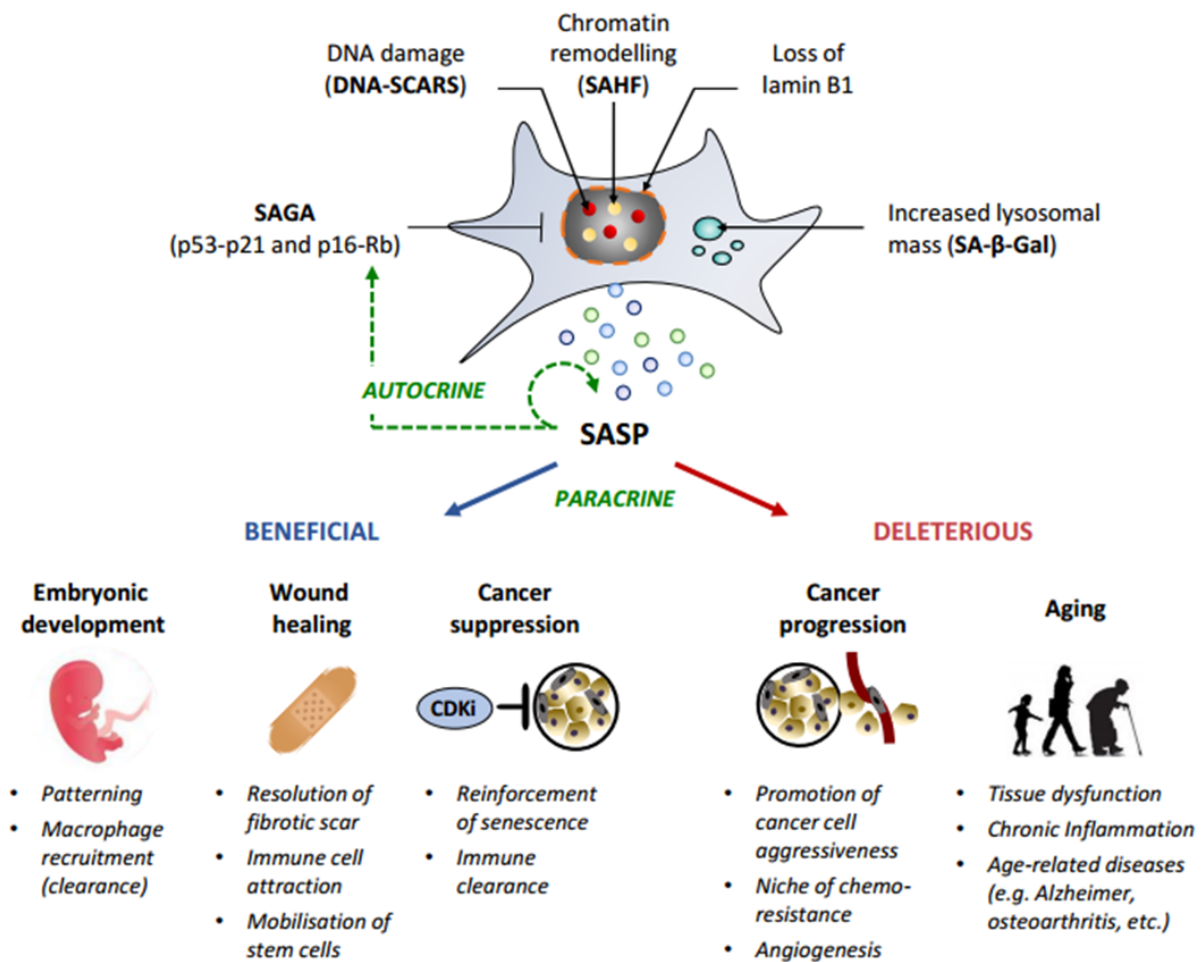
néoplasiques, mais aussi dans des cancers aux stades plus avancés, où les cellules vont être capables de sénescer, notamment suite à la thérapie (Shay and Roninson, 2004; Coppé et al., 2010; Schmitt et al., 2002). De plus, il a été proposé que le recrutement des cellules immunitaires par le PSAS va permettre la clairance des cellules cancéreuses (Rodier and Campisi, 2011). Le rôle anti cancéreux de la sénescence a notamment été confirmé dans un modèle où le retrait de la capacité à sénescer augmentait le développement de tumeurs dans les prostates murines (Chen et al., 2005).

#### La sénescence promotrice de tumeur

Bien que cela semble paradoxal, la sénescence peut également promouvoir le développement d'une tumeur déjà établie. En effet, il semblerait que certains composants du PSAS aient un rôle pro-oncogénique. Par exemple, GRO $\alpha$  (Growth-related oncogene) est connu pour stimuler la prolifération des cellules épithéliales pré-cancéreuses (Coppé et al., 2010; Bavik et al., 2006). Les MMP, en dégradant la matrice, vont permettre l'invasion des cellules (Coppé et al., 2010; Kang et al., 2003). Les interleukines IL-6 et IL-8 sont connues pour augmenter la capacité invasives des cellules, notamment en encourageant la transition épithélio-mésenchymateuses et donc la formation de métastases (Coppé et al., 2010). Enfin, le PSAS comporte du VEGF, un facteur pro-angiogénique majeur qui va favoriser la migration et l'invasion des cellules endothéliales. Cela va augmenter la vascularisation tumorale ainsi que la probabilité de former des métastases (Ksiazek et al., 2008).

## Vieillissement

Finalement, la sénescence est intimement liée au vieillissement des cellules et de l'organisme. Au niveau cellulaire, elle correspond à l'horloge biologique des cellules et délimite leur potentiel prolifératif : c'est la sénescence répllicative (voir "Sénescence induite par le raccourcissement des télomères"). À l'échelle d'un organisme, la connexion est également très forte. Dans des modèles de souris transgéniques ayant une forte activité en p53, l'absence notable de cancer était accompagnée d'un vieillissement prématuré, avec une accumulation de cellules sénescents (Tyner et al., 2002; Maier et al., 2004). On observe également une quantité importante de cellules sénescences dans les tissus âgés et les gènes associés à la sénescence sont également fortement exprimés (Sharpless and DePinho, 2004). En effet, la sénescence prévenant la prolifération cellulaire, elle limite le renouvellement et la régénération cellulaire, ce qui augmente le risque de dysfonction tissulaire et le développement de maladies associées (Drummond-Barbosa, 2008). Effectivement, la sénescence est retrouvée dans de nombreuses maladies associées à l'âge : athérosclérose (Vasile et al., 2001; Fenton et al., 2004), arthrite, ulcère, cirrhose (Wiemann et al., 2002). Le PSAS semble également participer à cette usure du tissu, d'une part via les protéases qui peuvent dégrader le tissu, d'autre part via les interleukines qui créent un microenvironnement pro-inflammatoire (Krizhanovsky et al., 2008; Liu and Hornsby, 2007; Parrinello et al., 2005). Cette inflammation chronique contribue au développement des maladies liées à l'âge.



**Figure 6 : Marqueurs de la sénescence et ses effets sur l'organisme**

La sénescence est caractérisée par tout un panel de marqueurs qui servent à son identification. Parmi eux, le SASP joue un grand rôle dans la modification du microenvironnement cellulaire, en ayant des effets bénéfiques ou délétères sur l'organisme selon le contexte. *Par Malaquin et Martinez, Exp Gerontol, 2016* – Autorisation d'utiliser cette figure obtenue

## **Les inducteurs de sénescences**

La sénescence peut survenir en réponse à différents stress génotoxiques :

### Oncogènes

L'apparition du cancer se fait suite à un enchainement d'évènements mutagéniques qui vont conférer à la cellule un avantage prolifératif. Cet avantage peut venir de l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur, ou de l'activation d'un oncogène. Dans ce cas de stress oncogénique, la cellule va entrer en sénescence afin d'empêcher une prolifération anarchique. Les mécanismes utilisés sont très conservés dans les différentes lignées cancéreuses et de nombreux oncogènes sont impliqués dans cette protection. Parmi eux, on trouve Ras, Myc ou b-Raf qui, en accélérant le rythme de la phase S, vont causer un effondrement de la fourche de réplication (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007). Cela va alors induire des dommages à l'ADN et une RDA qui mènera ultimement à l'activation de p21 et donc, à la sénescence (Di Micco et al., 2006; Maya-Mendoza et al., 2015). Cette barrière est indispensable pour empêcher l'évolution de lésions pré-néoplasiques en cancers plus agressifs.

### Les espèces réactives d'Oxygène

Les espèces réactives d'Oxygènes (ROS) sont des composés chimiques riches en Oxygène hautement réactifs, issus du métabolisme cellulaire (cycle de Krebs, chaîne respiratoire mitochondriale), ou de stress externes (fumée, radiation). Si ces ROS sont indispensables à l'homéostasie et à la signalisation cellulaire (Devasagayam et al., 2004), une quantité excessive peut endommager gravement la cellule. En effet, une ablation des ROS empêche le développement normal de l'embryon, alors qu'une exposition trop intense peut causer des

cassures dans l'ADN qui mèneront à la sénescence (Chen et al., 1995; Dumont et al., 2000). Par ailleurs, c'est pour cela que l'oxydation est intimement liée au vieillissement : des modèles de souris où les enzymes antioxydantes (SOD) étaient inactivées présentaient une espérance de vie significativement réduite (Muller et al., 2007). À l'inverse, si les SOD étaient surexprimées, les souris voyaient leur espérance de vie nettement augmentée (Van Raamsdonk and Hekimi, 2009). C'est la théorie des radicaux libres. La régulation des ROS est donc indispensable au maintien de l'intégrité cellulaire.

### Radiations et dommages à l'ADN

L'exposition des cellules aux radiations (UV, gamma, X) vont causer des dommages à l'ADN variés et plus ou moins complexes, qui vont être pris en charge par différents mécanismes. Les UV vont générer des torsions d'hélices qui vont être prises en charge par les voies d'excision de bases (BER) ou de nucléotides (NER), tandis que les rayons X vont créer des cassures doubles brins qui vont être détectées par la RDA (*voir section "DNA SCARS et RDA persistante"*) et réparées par recombinaison homologue (HR) ou jonction non homologue des extrémités (NHEJ). Dans tous les cas, si la cellule ne parvient pas à réparer ses dommages, la cellule ne va pas pouvoir réintégrer le cycle cellulaire et va entrer en sénescence (Alessio et al., 2014).

### Raccourcissement des télomères

Tel que décrit plus haut, le problème de réplication des extrémités entraîne le raccourcissement progressif des télomères à chaque phase de réplication de l'ADN et donc, à

chaque division. Finalement, le télomère va atteindre une longueur critique à laquelle il sera trop court pour adopter sa conformation de t-loop. Comme expliqué précédemment, cette structure 3-D est indispensable à la protection de l'extrémité chromosomique, puisqu'elle empêche sa reconnaissance par les systèmes de détection et de réparation des dommages. L'extrémité d'ADN va alors être révélée et reconnue par la cellule comme une cassure double brin. Il y aura donc une activation de la RDA (d'Adda di Fagagna et al., 2003), qui semble-t-il, serait légèrement différente de celle activée suite à une cassure double brin intra-génomiques, puisqu'elle serait dépendante de ATM et indépendante de Chk2 (Cesare et al., 2013). Notons que Chk2 joue toutefois un rôle dans le maintien de la sénescence répllicative, puisque son inactivation dans des cellules sénescents entraîne la reprise de la prolifération (Gire et al., 2004; Gire, 2004). Dans tous les cas, l'ouverture de la boucle télomérique mènera à la formation de foyers dommages télomériques, avec le recrutement de 53BP1 et la phosphorylation du variant d'histone H2AX ( $\gamma$ H2AX) (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Le modèle propose que l'accumulation télomères raccourcis (donc ouverts) mène à l'entrée en sénescence répllicative de la cellule (Martens et al., 2000; Zou et al., 2004; Hemann et al., 2001). Ainsi, il n'y a aucune certitude quant au nombre de télomères nécessaire à la mise en place de cet arrêt de croissance stable, si ce n'est qu'une quantité limitée de dommages télomériques ne suffira pas et va être tolérée par la cellule. C'est sur cette observation que nous avons démarré notre étude.

# **HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**

## **PRÉMISSE**

Bien que la sénescence répllicative ait été découverte il y a plus de 50 ans, les détails des mécanismes reliant raccourcissement télomériques, RDA et sénescence doivent encore être élucidés. Par exemple, le nombre de télomères nécessaire à l'établissement d'un arrêt de croissance permanent est inconnu. Pendant longtemps, il fût admis qu'une unique cassure double brin était suffisante, mais de nombreuses évidences plus récentes ont montré une capacité de tolérance des dommages à l'ADN de la part des cellules, puisqu'elles sont capables de se diviser en présence de foci (Zou et al., 2004; Martens et al., 2000; Kaul et al., 2012).

Certaines équipes ont émis l'hypothèse de l'existence d'un télomère sentinelle qui une fois raccourci allait déclencher la mise en place du phénotype sénescence (Hemann et al., 2001). En effet, étant donné que la variation de longueur des télomères de certains chromosomes est conservée entre les populations, on pourrait penser que cela corrèlerait avec le déclenchement de la sénescence.

Mais ce modèle a été écarté par plusieurs équipes qui n'ont pas réussi à retrouver de corrélation : la longueur initiale du télomère ne prédit pas la mise en place de la sénescence (Zou et al., 2004; Martens et al., 2000). De plus, la vitesse de raccourcissement est très variable et ce, de part des facteurs à la fois intrinsèques et environnementaux. Tout d'abord, le mécanisme de réplication en lui-même fait que les 2 cellules filles vont hériter de cellules dont les télomères feront des longueurs différentes. Finalement, les stress génotoxiques peuvent causer des



dommages aux télomères qui vont donc raccourcir de façon importante, indépendamment de la réplication. En effet, plusieurs études ont souligné les télomères étaient plus sensibles aux cassures à l'ADN, puisque que l'inhibition de la RDA rend certains dommages irréparables (Fumagalli et al., 2012). Les télomères sont donc moins résistants face au stress génotoxique auquel la cellule peut être exposée aléatoirement. Ainsi, deux télomères la même la longueur initiale vont finalement se retrouver à des états très différents après plusieurs cycles de divisions.

## **PROBLÉMATIQUE**

Les études sur la quantité de dommages nécessaire à l'arrêt de croissance ont fait ressortir la même constatation : un unique télomère ne suffit pas à déclencher la sénescence dans les cellules humaines (Zou et al., 2004; Martens et al., 2000; Kaul et al., 2012). En effet, les cellules semblent capables de tolérer un certain nombre de télomères raccourcit avant de finalement sortir du cycle cellulaire et d'arrêter de proliférer.

Nous nous sommes demandé à quel point la cellule pouvait tolérer ces dommages télomériques ? Combien de télomères ouverts la cellule est-elle capable de tolérer avant d'entrer en sénescence ?

## **OBJECTIFS**

Afin de répondre à cette question, nous avons décidé de commencer par le cas le plus extrême où tous les télomères étaient ouverts. Pour cela, nous avons utilisés un modèle bien caractérisé d'induction de dysfonction télomérique (Kim et al., 2004, 2008).

Nous avons infecté des cellules humaines normales avec un dominant négatif d'une des protéines du télosome, Tin2DN. Après induction à la Doxycycline, les cellules expriment Tin2DN se retrouvent avec tous leurs télomères ouverts, et deviennent sénescents. Cette protéine était un choix particulièrement intéressant car son rôle est exclusivement structural. Ainsi, on s'assurait de ne jouer que sur l'ouverture de la chromatine, sans inhiber directement de fonction protéique. En effet, Tin2 est le pivot du télosome et permet la stabilisation globale du complexe.

Nous avons voulu établir la cinétique d'entrée en sénescence des cellules, car si le résultat final est connu, la réponse primaire des cellules aux dommages télomériques n'a pas été étudiée. Ainsi, nous avons induit nos cellules de façon continue pendant 168h (temps requis à l'observation de l'ensemble des marqueurs de sénescence) en les fixant à chaque 24h pour observer l'état cellulaire.

Nous nous sommes concentrés sur la capacité de prolifération, les dommages à l'ADN et la stabilité du génome. Une fois le déroulement d'entrée en sénescence suite à une dysfonction de la chromatine télomérique établi, nous avons observé l'activation de la voie de RDA et l'avons comparé à celle obtenue après irradiation. Finalement, nous nous sommes interrogés sur l'implication d'une voie moléculaire majeure de la sénescence, p53, en l'inactivant par sh dans ces mêmes cellules. Nous avons également reproduit nos résultats avec un shTin2, afin de s'assurer de la reproductibilité de notre modèle.

# RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

**Telomeric dysfunction triggers an unstable growth arrest leading to irreparable genomic lesions and entry into cellular senescence**

Running title: Multistep entry into telomere-mediated senescence

Sabrina Ghadaouia<sup>1</sup>, Marc Alexandre Olivier<sup>1</sup>, Aurélie Martinez<sup>1</sup>, Nicolas Malaquin<sup>1</sup>,  
Guillaume B Cardin<sup>1</sup>, Francis Rodier<sup>1,2,#</sup>

<sup>1</sup> CRCHUM et Institut du cancer de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>2</sup> Université de Montréal, Département de radiologie, radio-oncologie et médecine nucléaire,  
Montreal, QC, Canada

# Corresponding author:

Francis Rodier, PhD

CRCHUM Pavillon R, R10-420

900 Rue St-Denis

Montreal, QC, H2X 0A9, Canada.

Phone: 1 (514) 890 8000 ext :26939

Email: francis.rodier@umontreal.ca

Key words: Aging, Cancer, Chromatin, DDR, DNA repair, Genomic Instabilities Mitotic Catastrophe, Replicative Senescence, Shelterin complex, Telomeres, Tin2

## ABSTRACT

Replicative senescence is the permanent growth arrest caused by gradual telomere attrition occurring at each round of genome replication. Critically shortened telomeres lose their protective shelterin complex and t-loop structure, revealing uncapped chromosome ends that are recognized as DNA double-strand breaks, and triggering a p53-dependent DNA damage response (DDR) towards proliferation arrest. Because telomeres are heterogeneous in length within a single cell, the number of short telomeres necessary for senescence onset remains ill defined. Using controlled Tin2-mediated shelterin inactivation, we show that telomere uncapping is not sufficient to trigger senescence. While uncapping generates expected telomeric DNA damage detection, the associated weak DDR allows a rapid bypass of the primary growth arrest and re-entry into the cell cycle despite dysfunctional telomeres. During the ensuing mitosis, fused telomeres lead to additional DNA breaks and to genomic instability including chromosomes bridges or micronuclei, which sustained a secondary entry into stable growth arrest. The loss of p53 prevented both primary and secondary growth arrests, leading to amplified genomic instability. Our results support a new multistep model for entry into telomere-mediated replicative senescence in normal cells, which is not directly induced by telomere uncapping, but rather by an amplification of DNA lesions caused by telomere fusions that leads to permanent irreparable genome damage.

Word 208

## INTRODUCTION

Replicative cell senescence was described based on the observation that cultured cells have a limited proliferation potential leading to an irreversible growth arrest associated with telomere shortening <sup>1,2</sup>. Cellular senescence is involved in several physiological mechanisms such as aging, wound healing, cancer suppression, and cancer promotion <sup>3</sup>.

Telomeres are non-coding repetitive DNA sequences at the extremity of every chromosome and play an essential role to protect the free DNA ends from exonuclease-mediated degradation or end-to-end fusions <sup>4</sup>. Telomeric end protection is provided by the telosome, or shelterin complex, formed by 6 subunits (TRF1, TRF2, Tin2, Rap1, POT1, and TPP1) that assemble on the telomeric DNA repeats <sup>5,6</sup>. The complex forces telomeres into a t-loop structure, where the single-stranded DNA overhang is hidden <sup>5,6</sup>. Telomere repeat factors (TRF) 1 and 2 bind directly to telomeric double-strand DNA, while protection of telomere 1 (POT1) binds simultaneously to the single-strand DNA overhangs and to TRF2. Repressor / activator protein 1 (Rap 1) interacts with TRF2, while TIN2-PTOP-PIP1 (TPP1) binds to POT1. Finally, TRF1-2 interacting nuclear protein 2 (Tin2) creates a bond between TRF1-TRF2 and the POT1-TPP1 complexes, thereby bridging shelterin subunits that are attached to double-stranded DNA and those that are attached to single-stranded DNA. Altogether, these proteins ensure the stability of the t-loop, and therefore contribute to the protection of the chromosome extremity. Additionally, the shelterin complex can provide active inhibition of the DNA damage response (DDR), which is responsible for cell cycle checkpoint signalling and for DNA repair at telomeres, thus preventing untimely activation of cell cycle checkpoints or chromosome end-to-

end fusions during DNA replication <sup>4,7</sup>. For example, TRF2 <sup>4</sup> and POT1-TPP1 dimer <sup>7</sup> prevent the activation of ATM and ATR, the two main upstream kinases for DDR, following double-strand breaks (DSB) or single-strand breaks (SSB) respectively. Similarly, direct inhibition of DNA repair pathways such as Ku70/Ku80-associated non-homologous end joining (NHEJ), is mediated by TRF2 <sup>8</sup> and Rap1 <sup>9</sup>. Overall, telomeric end protection via the shelterin complex is crucial to ensure genome stability during cell division.

In addition to their role in preventing genome instability, telomeres act as a reflection of cellular aging, as the ‘‘end replication problem’’ causes their shortening at every cell division <sup>10</sup>. Following several rounds of erosion, telomeres become too short to form a proper t-loop and can no longer protect the DNA at chromosome ends <sup>5</sup>, resulting in a DDR, associated with the formation of telomeric DNA damage foci (DDF) that co-localize with 53BP1 and  $\gamma$ H2AX <sup>11</sup>. This leads to the activation of DDR and p53-mediated cell cycle checkpoints that definitively arrest the proliferation of normal cells, establishing replicative senescence <sup>11-15</sup>.

Despite this mechanistic understanding of telomere-mediated senescence, a key question regarding the initiation and maintenance of a stable replicative senescence growth arrest in mammalian cells remains unanswered: how many uncapped telomeres are necessary to trigger replicative senescence? This question emerges from the fact that telomeres are heterogeneous in length within single cells <sup>16</sup>, and the rate of shortening varies significantly between telomeres due to random telomeric DNA breaks <sup>17</sup> and to the end replication problem itself <sup>10,18</sup>. Overall, the rate varies between 50 and 150 bp per replication, and the average telomere length prior to senescence is 1–2 kb <sup>19</sup>. Therefore, it remains impossible to predict which telomere will be shortened in a cell nearing replicative senescence.

Surprisingly, mammalian telomeres shorter than 1 kb could still be observed in proliferating cells <sup>19</sup>. These normal cells were also able to proliferate with telomeres that were too short to be recognized by probe hybridization <sup>21</sup>, suggesting that mammalian cells can possibly tolerate a certain amount of dysfunctional telomeres. Similarly, stable short telomeres were observed in proliferating fibroblasts, suggesting that a limited number of short telomeres did not prevent proliferation <sup>21,22</sup>. It has been suggested that approximately 5–10 dysfunctional telomeres, perhaps even more, are required to trigger replicative senescence <sup>21,22</sup>.

Taken together, it appears that a single short telomere is not sufficient to trigger replicative senescence in mammals, and that cells are able to proliferate while harbouring an as yet undefined number of dysfunctional telomeres. To test cell tolerance for telomere DNA damage, we used a different approach and took advantage of the fact that disruption of telomeric chromatin can be controlled via the inactivation of essential components of the shelterin complex, leading to immediate telomere uncapping and DDR activation <sup>4,23,24</sup>. We used a well characterized model of normal human fibroblasts harbouring an inducible dominant negative mutant of Tin2 that cannot bind TRF1, Tin2DN (Tin2-15C in <sup>25,26</sup>). We tested to what extent cells could tolerate direct telomere uncapping, irrespective of telomere length, and found that normal human cells were tolerant of widespread telomere uncapping. While t-loop disruption triggered a telomeric DDR that eventually lead to cellular senescence, a time course follow-up of entry into senescence revealed a multistep relationship with telomeric damage and growth arrest. We reveal a cell cycle checkpoint bypass in the presence of telomeric DDF that causes secondary breaks and genomic instabilities, and demonstrate that a permanent senescence

growth arrest in normal cells is associated with irreversible genome damage caused by a telomeric fusion-bridge-break cycles.

## **MATERIAL AND METHODS**

Cell culture: Normal human fibroblasts (HCA2 and BJ-U) were cultured at 37°C with 20% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM media (Multicell, Wisent Inc.) with 8% FBS (Fetal Bovine Serum) and 5% antibiotics: penicillin and streptomycin (Wisent Inc.). IMR90 cells, another type of normal human fibroblasts, were cultured in the same media, but at 5% O<sub>2</sub>. Cells were then treated with (Dox ON) or without (Dox OFF) Doxycycline at 30 ng/mL for 168 h with fixation at every 24 h for analysis. For our low serum studies, cells were cultured with 0.1% FBS DMEM media.

Live Imaging: We performed live-imaging acquisition using IncuCyte ZOOM system, a microscope integrated to the incubator to obtain real time cell imaging. We used BJ-U TR4s Tin2DNs +/- shp53 H2B GFP cells to visualize nuclei and follow our cells throughout induction. We took pictures every hour for 168h in order to observe mitosis.

Genetic modifications of primary cells: We used two types of primary normal human fibroblasts: HCA2 and BJ-U. Using Invitrogen's Gateway technology (Campeau et al., 2009), we infected them with lentivirus containing a Tetracyclin Repressor (TetR), creating HCA2 TR3s and BJ-U TR4s primary cells. Still using the Gateway system, we infected HCA2 cells with a lentivirus containing p16 to obtain HCA2 TR3s p16s, primary normal human fibroblasts with the ability to express p16 when induced with Doxycycline. Similarly, we created BJ-U TR4s Tin2DNs and BJ-U TR4s shTin2s. In addition, BJ-U TR4s Tin2DNs cells were infected



with constitutively expressed lentivirus (Doxycycline independent) to create the following cells: BJ-U TR4s Tin2DNs H2B-GFP, BJ-U TR4s Tin2DNs shp53 and its control BJ-U TR4s Tin2DNs shGFP.

Immunofluorescence: Cells were cultured in 4 well chamber slides (Nunc, Penfiled) then fixed in 10% formalin (Sigma). Cells were then permeabilised with PBS containing 0.25% Triton X-100 and fixed in a blocking buffer composed of 1% BSA (Jackson Immuno Research) and 4% donkey serum (Jackson ImmunoResearch) in PBS. Primary antibodies were incubated at 4°C overnight in the blocking buffer, then washed for 30 min at room temperature. They were used to detect 53BP1 (NB100-304, Novus Biologicals), diluted at 1/2000; gH2AX S139 (05-636-I, Millipore) at 1/2000; and p16 (JC8, Santa Cruz) at 1/300. Secondary antibodies (Alexa Fluor 488nm or 647nm) were incubated for 1 h at room temperature, and diluted 1/800 in blocking buffer. Finally, slides were washed and mounted in ProLong Gold Antifade reagent with DAPI (Life Technologies). Images were acquired with a Carl Zeiss Axio Observer Z1 fluorescence microscope, and quantification was performed with Axio Vision software. First, DAPI staining allowed us to defined nuclei as primary objects. We then identify 53BP1 staining that is within the nuclei (i.e., primary object) and with an intensity above a defined intensity threshold and in between a size range. Finally, we obtain the number of 53BP1 foci in each nuclei.

Western Blot: Cells were lysed in MPER reagent (Thermo Scientific) with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Sigma) on ice, then centrifuged at 4°C for 15 min and sonicated at 4°C for 10 min. Protein samples were quantified using the BCA protocol (Thermo Scientific) and mixed with BlueJuice gel loading buffer (Invitrogen) and DTT (Sigma) before a 5 min incubation at 95°C. Samples were then loaded and separated in 4-15% precast SDS PAGE gels

(BioRad) for 1 h at 110 V before transfer onto a PVDF membrane (Immobilon) at 110 V at 4°C for 1 h. The membrane was then blocked in 2% BSA (Sigma) for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted in 2% BSA. Mouse antibody against pATM-S1927 (#4526) was diluted 1/2000 and the rabbit antibody against pchck2-T68 (#2661) at 1/1000 were from Cell Signalling. Mouse antibodies against p53 and p21 from BD Pharmingen (SX118) were diluted 1/200. After washing and incubation with the secondary HRP antibody, proteins were revealed with chemiluminescence (ECL Western blotting substrate, Thermo).

EdU: Cells were seeded in 4 well chamber slides (Nunc, Penfiled) and pulsed with the modified thymidine analogue EdU for 24 h, then fixed in 10% formalin (Sigma). EdU was then stained using the Click-iT protocol (Invitrogen) with the Alexa Fluor 647 dye. Slides were washed and mounted in ProLong Gold Antifade reagent with DAPI (Life Technologies). Images were acquired with a Carl Zeiss Axio Observer Z1 fluorescence microscope, and quantification was performed with Axio Vision software.

LiCor: Cells were cultured in 96 well plates and fixed in formalin (Sigma) before staining with Draq5 diluted at 1/10000 in PBS for 1 h. Plates were read with Odyssey Li-Cor plate reader (Mandel).

FACS: Cells were cultured in 6 well plates, trypsinized, centrifuged, fixed in 70% ethanol then stained with PI (Sigma) in 0.2% TritonX-100 with RNase A for 30 min. They were then sorted according to their DNA content with FACS. Analysis were made with the FlowJow software. We used the algorithm to define DNA content range and therefore separate our cell cycle phases.

## RESULTS

### Telomere dysfunction-induced cell growth arrest is unstable

To study the cell response following telomeric dysfunction, we induced expression of Tin2DN with Doxycycline treatment to open the t-loop and form telomeric DDF (*Figure S1a, b*). Alternatively, we also induced p16 expression to trigger a reference DNA damage-free senescence growth arrest<sup>28</sup>. The inductions lasted for 168 hours with cells fixed for analysis every 24 hours. We first measured general cell proliferation using a total DNA labelling dye, Draq5, and observed that while p16 expression results in a rapid and stable growth arrest, cells with telomeric damages induced by Tin2DN only slowed their proliferation to a level somewhat in-between control cells (non-induced) and p16-induced cells (*Figure 1a*).

To evaluate more precisely whether Tin2DN-induced cells simply proliferated more slowly or underwent sequences of growth arrest and regrowth we evaluated the amount of cells undergoing S phase during selected time periods using EdU pulses (*Figure 1b, c*). In the non-induced group, the proportion of cells in S phase was stable, as the population grew exponentially. In the p16 induced cells, we observed a stable DNA synthesis arrest that was established within 48 hours. However in Tin2DN-induced cells, we observed 3 distinct phases that began with a slight decrease in the amount of cells that replicated their DNA, showing a primary proliferation reduction that coincided with primary telomere uncapping (Fig1S a,b). Then, after 72 hours of Tin2DN induction, we observed an increase in the number of cells undergoing S phase, indicating that the cells passed through the G1/S checkpoint despite harboring telomeric DDF (*Figure 2a*). Finally, the proportion of proliferating cells decreased

steadily over the next few days and remained stable as cells entered senescence, as previously described for Tin2DN induction in normal cells<sup>25,26</sup>.

To further investigate cell cycle checkpoints bypassed in Tin2DN-induced cells we performed cell cycle FACS analysis during induction (*Figure 1d,e,f*), which revealed that p16-induced cells accumulated in G1 in less than 48 hours, as expected for the action of this cyclin-dependent kinase inhibitor<sup>28</sup>. Again, in Tin2DN-induced cells, we observed a complex multiple phase growth reduction process. The first phase involved a primary arrest with a decrease in the amount of S phase cells, and an increase in the amount of G1 and G2 cells. The second phase occurred after 72 hours of induction, where cells escaped G1 to enter S phase for approximately 48 hours. The final phase was an accumulation of the Tin2DN-induced cells in G1, with some cells remaining in G2. This last phase is consistent with the cell cycle distribution of primary HCA2 and BJ cells reaching replicative senescence<sup>29</sup>, supporting entry into senescence.

#### Bypass of the G2/M checkpoint in the presence of dysfunctional telomeres causes DNA breaks and genomic instability

We next quantitatively evaluated the amount of DSB-type DNA damage by quantifying 53BP1 DDF using immunofluorescence (*Figure 2a*). Again, we observed 3 distinct phases throughout induction with Tin2DN. During the first 48 hours, cells showed an increase of DDF corresponding to the expression of Tin2DN and the opening of the t-loop, revealing the end of the chromosome. The number of DDF reached a plateau until the time point at 96 hours, followed by a second increase in DDF with a final plateau, presumably as a consequence of secondary breaks due to coincident G2/M checkpoint bypass. As the final increase in DDF

coincided with growth recovery in these cells, we hypothesized that this increase was caused by the division of the cells with open telomeres, which could cause a high amount of genomic instabilities (GI) <sup>30</sup>. We thus counted micronuclei, chromosome bridges and nuclear fusions (*Figure 2b and c*), and observed an increase in the percentage of cells presenting GI after 144 hours of Tin2DN expression/induction. Alternatively, no GI is observed in p16 induced-senescent cells nor after the primary Tin2DN-induced growth arrest (*Figure 2b*). In order to confirm cell division-associated GI in real time, we then stably labelled the chromatin using H2B-GFP, which allowed us to follow cells in real time. We detected cells entering mitosis after 72 hours of induction, resulting in aberrant division as indicated by lagging chromosome, micro nuclei or mitosis duration above normal (*figure 2d*).

To confirm that the secondary breaks and GI were caused by cell division following checkpoint bypass, we prevented proliferation in Tin2DN induced cells using serum starvation (*Figure 2e*). Indeed, we did not observe any increase in the number of 53BP1 foci per cell nor GI when induced cells were kept in low serum (*Figures 2e and f*). To clearly validate whether increased DDF and GI are triggered by cells division, we added serum back to starved cells, which immediately restored proliferation (*Figure 2e, + FBS*) leading to the previously observed phenotype of increased DDF and GI (*Figures 2f, g + FBS*).

#### Tin2DN induction results in a weak, differential DDR

Telomeric dysfunction has been shown to trigger growth arrest and senescence via the activation of an ATM-dependent <sup>31</sup> DDR signalling defined by p53 activation <sup>11</sup> and weak Chk2 activity <sup>31</sup>. To validate this model, we probed the activity of these specific DDR events during

primary telomeric dysfunction-induced growth arrest and secondary break-induced senescence. We also compared it to 1 Gy of X-ray irradiation (IR) that corresponds to 35 randomly distributed DSBs<sup>32</sup>. This dose of irradiation is typically non-lethal and allows the cells to repair breaks and return to proliferation<sup>33</sup> as we observed in our system. We can therefore compare the strength of DDR activation following DNA DSB or telomere uncapping.

We observed two strong activations of ATM (*Figure 3a, arrow points at the bottom line*), after induction (time point 72h) and after the bypass (time point 168h) reflecting the 2 waves of damages: the primary telomeric uncapping that induced DNA damages, and secondary mitosis-induced DSB. The level of ATM phosphorylation was similar to the level obtained following 1Gy IR. However, we did not observe any significant activating phosphorylation of Chk2 following the primary response, whereas we detected strong phosphorylation following the bypass, at a similar level obtained by IR (*Figure 3a, c*). Interestingly, results obtained with Chk2 could explain previously conflicting results in the literature, where previous observations showed no activation of Chk2 following telomere uncapping<sup>31</sup>, while others showed that Chk2 was at least partially involved in the activation of replicative senescence<sup>34</sup>. As the DDR cascade progressed, we observed that the low activation of pChk2 following Tin2DN induction (*Figure 3a, c*) leads to weak stabilisation of p53 (*Figure 3a, d*) and consequently, weak production of p21 (*Figure 3a, e*). In contrast, the secondary breaks (occurring at approximately 120 h after induction, *Figure 2a*) resulted in strong activation of both Chk2, (*Figure 3a, c*) p53 (*Figure 3a, d*) and p21 (*Figure 3a, e*), at an amount similar to IR (*Figure 3a*). Therefore, two distinct waves of activation of the DDR cascade are demonstrated. The first one is exclusively caused by telomere uncapping, which is weak and does not include pChk2. The second activation is

stronger and includes the phosphorylation of Chk2, triggered by secondary random breaks or GI.

#### Tin2DN-induced growth arrest is p53-dependent.

Telomere uncapping has been shown to establish and maintain senescence via a DDR-p53-pathway<sup>11,12</sup>. Despite the weak early p53 activation that we observed by western blot immediately following Tin2DN induction (*Figure 3a*), we directly tested the importance of p53 during multistep entry into telomere-mediated senescence. We infected our cells with a control shGFP or an shp53 lentivirus (*Figure 4a*) and performed another induction. We observed that p53 negative cells did not stop proliferating after the induction of Tin2DN (*Figure 4b*), and accumulated DNA damage (*Figure 4c*) and GI (*Figure 4d*) more rapidly, suggesting that p53 regulates the primary telomere-induced growth arrest. Accordingly, time-lapse experiments showed a very high frequency of mitotic abnormalities from the very beginning of the induction. Cells continued dividing, even though they were accumulating signs of damage. Mitoses were extremely long (over 3 hours), led to mitotic catastrophe and resulted in nuclei with lagging chromosome and of abnormal shape (*Figure 4e*). Eventually, after multiple days, most cells underwent mitotic catastrophe and detached from the dish. Similar results were obtained in previous studies, where p53 inactivated cancer cell lines were particularly sensitive to shelterin-induced telomere dysfunction and underwent rapid cell death, possibly via mitotic catastrophe caused by telomere dysfunction<sup>26</sup>.

### Tin2 depletion generates multistep entry into senescence

To ensure that our observations were not the result of a peculiar effect caused by the dominant negative mutation in Tin2DN, we reproduced our induction using shTin2. Inducible Tin2 depletion similarly triggered telomere dysfunction that induced a primary arrest (*Figure 5a*), and secondary mitosis-induced DNA breaks (*Figure 5b*) that gave rise to GI and a stable senescence growth arrest (*Figure 5c*).



## DISCUSSION

### A new model for replicative senescence induction

By inducing telomeric dysfunction under controlled and specific conditions, we showed that dysfunctional telomeres are not direct inducers of senescence in normal human cells. Previous knowledge concerning entry into telomere-mediated replicative senescence stipulates that replicative senescence is caused by the direct activation of the DDR following the uncapping of telomeres. Alternatively, our model system showed an indirect mechanism where dysfunctional telomeres trigger senescence via the induction of secondary DNA breaks and GI. We find that the expression of Tin2DN uncapped telomeres and created a DDR with the formation of 53BP1 DDF as expected (*Figure 1S*). However, this telomere dysfunction-induced DDR was slightly different<sup>31</sup> and not as strong when compared to a DSB-induced DDR initiated by radiation. Indeed, we observed no activation of pChk2, and a weak activation of p53 and p21 (*Figure 3*). We speculate that these differences are the cause of the instability of the Tin2DN-induced growth arrest (*Figure 1*). The attenuated activation of cell cycle checkpoints following Tin2DN induction resulted in cells re-entering the cell cycle and dividing, despite the presence of dysfunctional telomeres. It has been well described that under many conditions a cell dividing with damaged DNA is likely to suffer from abnormal mitosis and GI<sup>35,36</sup>. This is what we observed in our system, with an increase in the number of 53BP1 DDF, and the appearance of signs indicating GI. We also confirmed that these abnormalities were related to mitosis as blocking cell division was sufficient to prevent GI or any increase in the number of DDF. These results showed that telomere uncapping leads to an unstable growth arrest that will cause

secondary breaks and GI, which will lead to senescence (*Figure 6*). It is interesting to note that this slight increase alone (from 4 to 8 foci per cell) is enough to establish a stable growth arrest, supporting the idea of a threshold of DDR. We could also speculate that the cells with the highest amount of damage died of mitotic catastrophe. Importantly, a high frequency of polyploidy and multiple chromosomal abnormalities have been reported in cells approaching senescence in several distinct studies<sup>37-40</sup>. This suggests that our observations are not confined to our system, but that our proposed multistep telomere-mediated senescence model may occur in natural aging through telomere shortening.

We hypothesize that the lack of stability may come from the limited activation of p53 and p21, however, when we repeated our time course induction in shp53-infected Tin2DN-induced cells, we observed no proliferation arrest with an accumulation of GI and a constant increase in the number of 53BP1 DDF. This showed that p53 activation, as weak as it may have been, was absolutely essential for primary growth arrest.

Altogether, these results propose a new model for replicative senescence, where the permanent growth arrest is not directly caused by the uncapped telomeres, but by the secondary breaks caused by the cell cycle checkpoints adaptation.

#### Loss of TRF2 might causes chromosome fusions

This conclusion proposed by our model may be unexpected and counter-intuitive since allowing cell division in the presence of DNA damage is a risk for inducing cancer. The evolutionary gain of this model is therefore questionable. Is DNA damage tolerance a flaw or

an active way of ensuring a permanent growth arrest? How does the cell ensure the balance between survival and genome stability?

A hypothesis would be that the loss of Tin2 function via the dominant negative mutation results in the loss of TFR2 as suggested by Kim et al.<sup>25</sup> and creates uncapped fusogenic telomeres<sup>4,41</sup>. The inhibition of DDR would therefore be lost, allowing fusions between chromosomes that could be interpreted by the cell as a DNA repair. The cell would then deactivate its checkpoints, re-enter into the cell cycle with fused telomeres, generating new damage. Nonetheless, we do not have any evidence that a similar consequence is taking place when we induce the expression of shTin2, although we observed exactly the same phenotype in both cases.

This model would be another verification of the importance of DDR inhibition at the telomeres, as it is the repair itself that causes new damage and GI. It is possible that this tolerance is an active mechanism, created to amplify the damages that would promote a strong proliferation arrest.

#### An example of checkpoint adaptation in mammals?

In yeast, cell cycle checkpoint adaptation allows the cell to re-enter into cell cycle and division in the presence of DNA damage in order to split the DNA lesions between the resulting two daughter cells, via an asymmetric division<sup>42</sup>. This guarantees the survival of at least one cell, while the other daughter cell dies of mitotic catastrophe. In multicellular organisms, the DNA damage adaptation could be a way to bring the cell into a cell phase that is more appropriate for repair<sup>43</sup>, or a preliminary step that leads to cell death by mitotic catastrophe<sup>44</sup>.

In this context, the cell cycle checkpoint bypass in the presence of DNA breaks would be a way of amplifying the damages, ensuring a subsequently strong proliferation arrest.

Another example is observed during DNA replication <sup>45</sup> where the DNA damage tolerance pathway or Translesion synthesis (TLS) is a process that allows DNA synthesis in the presence of DNA breaks. This error-prone mechanism prevents the block of the replication fork and allows the cell to continue through the cell cycle despite damage <sup>46</sup>.

Although, the maintenance of genome integrity is crucial to prevent mutations and cancer development, a cell cannot constantly stop the cell cycle at any sign of stress. The existence of several tolerance pathways allows the cell to continue its division in case of minor damage <sup>46</sup>.

In the case of telomeres, it is probably counteractive for cells to have telomeres detected as DNA damage, as it may introduce inappropriate fusions and recombination, specially during replication when the opening of the t-loop is inevitable. Hence, the t-loop serves to shield and protect the chromosome end, and the active inhibition of DNA damage detection and repair pathways by the proteins of the shelterin complex, prevents an excessive response from the cell. However, these tolerance mechanisms/strategies present a risk in that any dysfunction in another DDR pathway, such as p53, could lead to a very high amount of GI and could eventually create mutations that develop into cancer <sup>30,47,48</sup>.

In this study, we provide the first direct evidence of telomeric dysfunction tolerance in normal human cells. As cells divide with uncapped telomeres, they create new DSB that eventually lead to a permanent senescence associated cell growth arrest. We propose a new model for entry into replicative senescence, offering a new explanation for aging-associated

genomic damages and instabilities. Our results could also provide clues to explain how a cell can escape cellular senescence and transform into cells that become cancerous.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank members of the Rodier laboratory for valuable comments and discussions. We thank Jacqueline Chung for valuable comments and English editing. This work was supported by the Institut du cancer de Montréal and by grants from the Canadian Institute for Health Research [MOP114962]. FR is supported by the Fonds de Recherche Québec Santé junior I career award [22624]. SG is supported by an Institut du cancer de Montréal Canderel scholarship.

## REFERENCES

1. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458–460 (1990).
2. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).
3. Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* **192**, 547–556 (2011).
4. van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**, 401–413 (1998).
5. Griffith, J. D. *et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503–514 (1999).
6. Palm, W. & de Lange, T. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 301–334 (2008).
7. Denchi, E. L. & de Lange, T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* **448**, 1068–1071 (2007).
8. Ribes-Zamora, A., Indiviglio, S. M., Mihalek, I., Williams, C. L. & Bertuch, A. A. TRF2 Interaction with Ku Heterotetramerization Interface Gives Insight into c-NHEJ Prevention at Human Telomeres. *Cell Rep.* **5**, 194–206 (2013).
9. Sarthy, J., Bae, N. S., Scrafford, J. & Baumann, P. Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres. *EMBO J.* **28**, 3390–3399 (2009).
10. Levy, M. Z., Allsopp, R. C., Futcher, A. B., Greider, C. W. & Harley, C. B. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* **225**, 951–960 (1992).
11. d’Adda di Fagagna, F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194–198 (2003).
12. Beauséjour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212–4222 (2003).
13. Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J. & Sedivy, J. M. Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21CIP1, but Not p16INK4a. *Mol. Cell* **14**, 501–513 (2004).
14. Armanios, M. Y. *et al.* Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1317–1326 (2007).

15. Smogorzewska, A. & de Lange, T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* **21**, 4338–4348 (2002).
16. Londoño-Vallejo, J. A., DerSarkissian, H., Cazes, L. & Thomas, G. Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3164–3171 (2001).
17. von Zglinicki, T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 339–344 (2002).
18. Lingner, J., Cooper, J. P. & Cech, T. R. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* **269**, 1533–1534 (1995).
19. Martens, U. M., Chavez, E. A., Poon, S. S., Schmoor, C. & Lansdorp, P. M. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp. Cell Res.* **256**, 291–299 (2000).
20. Sandell, L. L. & Zakian, V. A. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**, 729–739 (1993).
21. Zou, Y., Sfeir, A., Gryaznov, S. M., Shay, J. W. & Wright, W. E. Does a Sentinel or a Subset of Short Telomeres Determine Replicative Senescence? *Mol. Biol. Cell* **15**, 3709–3718 (2004).
22. Kaul, Z., Cesare, A. J., Huschtscha, L. I., Neumann, A. A. & Reddel, R. R. Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells. *EMBO Rep.* **13**, 52–59 (2012).
23. Hockemeyer, D., Sfeir, A. J., Shay, J. W., Wright, W. E. & de Lange, T. POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *EMBO J.* **24**, 2667–2678 (2005).
24. Guo, X. *et al.* Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis. *EMBO J.* **26**, 4709–4719 (2007).
25. Kim, S. *et al.* TIN2 Mediates Functions of TRF2 at Human Telomeres. *J. Biol. Chem.* **279**, 43799–43804 (2004).
26. Kim, S. *et al.* Telomere dysfunction and cell survival: roles for distinct TIN2-containing complexes. *J. Cell Biol.* **181**, 447–460 (2008).
27. Campeau, E. *et al.* A Versatile Viral System for Expression and Depletion of Proteins in Mammalian Cells. *PLoS ONE* **4**, (2009).



28. Coppé, J.-P. *et al.* Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J. Biol. Chem.* **286**, 36396–36403 (2011).
29. Mao, Z., Ke, Z., Gorbunova, V. & Seluanov, A. Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. *Aging* **4**, 431–435 (2012).
30. Cheung, A. L. M. & Deng, W. Telomere dysfunction, genome instability and cancer. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 2075–2090 (2008).
31. Cesare, A. J., Hayashi, M. T., Crabbe, L. & Karlseder, J. The telomere deprotection response is functionally distinct from the genomic DNA damage response. *Mol. Cell* **51**, 141–155 (2013).
32. Asaithamby, A. & Chen, D. J. Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose  $\gamma$ -irradiation. *Nucleic Acids Res.* **37**, 3912–3923 (2009).
33. Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* **11**, 973–979 (2009).
34. Gire, V. Dysfunctional telomeres at senescence signal cell cycle arrest via Chk2. *Cell Cycle Georget. Tex* **3**, 1217–1220 (2004).
35. Hayashi, M. T. & Karlseder, J. DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. *Oncogene* **32**, 4593–4601 (2013).
36. Ganem, N. J. & Pellman, D. Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *J. Cell Biol.* **199**, 871–881 (2012).
37. Saksela, E. & Moorhead, P. S. Aneuploidy in the degenerative phase of serial cultivation of human cell strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **50**, 390–395 (1963).
38. Thompson, K. V. A. & Holliday, R. Chromosome changes during the in vitro ageing of MRC-5 human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **96**, 1–6 (1975).
39. Benn, P. A. Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. *Am. J. Hum. Genet.* **28**, 465–473 (1976).
40. Sherwood, S. W., Rush, D., Ellsworth, J. L. & Schimke, R. T. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 9086–9090 (1988).
41. Cesare, A. J. & Karlseder, J. A three-state model of telomere control over human proliferative boundaries. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 731–738 (2012).

42. Galgoczy, D. J. & Toczyski, D. P. Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1710–1718 (2001).
43. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–1078 (2009).
44. Bahassi, E. M. Polo-like kinases and DNA damage checkpoint: beyond the traditional mitotic functions. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **236**, 648–657 (2011).
45. Chang, D. J. & Cimprich, K. A. DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 82–90 (2009).
46. Waters, L. S. *et al.* Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **73**, 134–154 (2009).
47. Swift, L. H. & Golsteyn, R. M. Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 3403–3431 (2014).
48. Collado, M., Blasco, M. A. & Serrano, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* **130**, 223–233 (2007).

## FIGURE LEGENDS:

Figure 1: Tin2DN induced growth arrest is unstable (a) Cells were treated with Doxycycline to express p16 or Tin2DN and fixed at different time points. Control cells were not induced. They were stained with Draq5 and the mean fluorescent intensity (MFI) measured with LiCor. Error bars correspond to the standard deviation between the 3 repetitions (b) Cells were treated with Doxycycline and EdU was added to the media 24h prior to fixation. Cells were then stained and EdU positive cells quantified. Error bars correspond to the standard deviation between the 5 repetitions (c) Representative images of the 48 h time point are shown for each condition. (d,e,f) Cells were treated with Doxycycline and trypsinised at different time points. They were then stained with PI and DNA content was quantified with FACS. Here are shown the proportion of cells (d) S, (e) G1 and (f) G2 phases through time. Error bars correspond to the standard deviation between the 2 repetitions

Figure 2: Cell division in the presence of dysfunctional telomeres causes secondary breaks and genomic instability (a) Cells were treated with Doxycycline and fixed at different time points to perform immunofluorescence of 53BP1. Quantification of the mean number of foci per nuclei through time is shown. Error bars correspond to the standard deviation between the 5 repetitions (b) Quantification of the percentage of p16 or Tin2DN-induced cells showing at least one sign of genomic instability at different time points. We manually counted the number of cells showing either nuclei fusion, chromosome bridge, micronuclei or abnormal shaped nuclei. Error bars correspond to the standard deviation between the 5 repetitions (c) Examples of genomic

instabilities observed after 144h of Tin2DN induction are shown with DAPI staining: nuclear fusion (top), chromosome bridge (middle) and micronuclei (bottom). *(d)* Pictures from live imaging of individual cells where Tin2DN was induced. The cells were pre-infected with H2B GFP to visualise DNA. Arrows are showing abnormal shaped nuclei (74h) chromosome bridge (77h) and micronuclei (92h-93h). *(e)* Cells were induced in serum starvation media (0.1%FBS) to prevent cell division. Cells re-proliferate when FBS is added to the media at 96h (+FBS). Error bars correspond to the standard deviation between the 3 repetitions *(f)* Quantification of the number of 53BP1 foci during low serum induction (0.1%FBS), or when serum is added to the media at 96h (+FBS) Error bars correspond to the standard deviation between the 3 repetitions *(g)* Quantification of the percentage of p16 or Tin2DN-induced cells showing at least one sign of genomic instability at different time points. We manually counted the number of cells showing either nuclei fusion, chromosome bridge, micronuclei or abnormal shaped nuclei during low serum induction (0.1%FBS), or when serum is added to the media at 96h (+FBS). Error bars correspond to the standard deviation between the 3 repetitions.

Figure 3: Telomeric dysfunction induces a weak DDR *(a)* Cells were induced with Tin2DN and protein extracted at different time points. Western blot of DDR components throughout induction and at 4 h after 1 Gy X-Ray irradiation. Quantification of signal was performed with ImageJ and normalized to GAPDH levels for *(b)* pATM, *(c)* pChk2, *(d)* p53 and *(e)* p21. N=1

Figure 4: Tin2DN-induced growth arrest is p53-dependant *(a)* BJ-U TR4s Tin2DNs cells were infected with an shp53 and, after selection, protein were extracted to validate the reduction of

the level of p53 expression by western blot. (b) Cells were treated with Doxycycline and EdU was added to the media 24h prior to fixation. Cells were then stained and EdU positive cells quantified. Error bars correspond to the standard deviation between the 3 repetitions. (c) Cells were treated with Doxycycline and fixed at different time points to perform immunofluorescence of 53BP1. Quantification of the mean number of foci per nuclei through time is shown. Error bars correspond to the standard deviation between the 3 repetitions. (d) Quantification of the percentage of cells showing at least one sign of genomic instability. We manually counted the number of cells showing either nuclei fusion, chromosome bridge, micronuclei or abnormal shaped nuclei. Error bars correspond to the standard deviation between the 3 repetitions. (e) Pictures from live imaging of individual BJ-U TR4s Tin2DNs shp53 during induction. The cells were pre-infected with H2B GFP to visualise DNA. We can observe several examples of extended mitosis (3-4h long) resulting in chromosome bridges (arrows at 52h and 64h) micronuclei (arrow at 87h) or even mitotic catastrophe (82-83h).

Figure 5: Results are reproducible with shTin2 (a) Cells were treated with Doxycycline and EdU was added to the media 24h prior to fixation. Cells were then stained and EdU positive cells quantified. Error bars correspond to the standard deviation between the 3 repetitions. (b) Cells were treated with Doxycycline and fixed at different time points to perform immunofluorescence of 53BP1. Quantification of the mean number of foci per nuclei through time is shown. Error bars correspond to the standard deviation between the 3 repetitions. (c) Quantification of the percentage of p16 or Tin2DN-induced cells showing at least one sign of genomic instability at different time points. We manually counted the number of cells showing

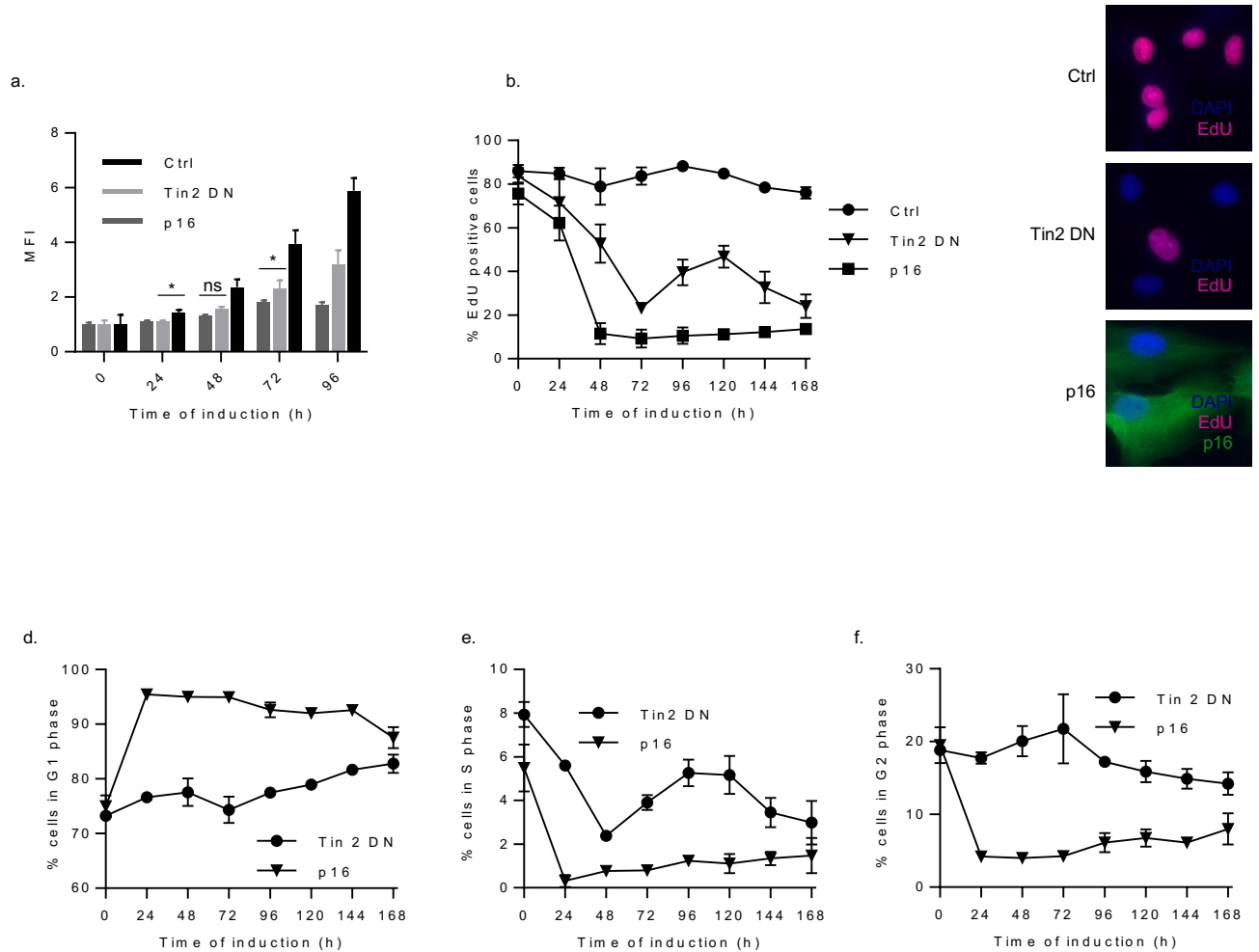
either nuclei fusion, chromosome bridge, micronuclei or abnormal shaped nuclei. Error bars correspond to the standard deviation between the 3 repetitions.

Figure 6: A new model for entry into senescence following telomeric dysfunction This model is based upon our results which show alignment between the time-course of EdU proliferation and the timeline of 53BP1 DDF formation. We conclude that the expression of Tin2DN induced by Doxycycline treatment (+ Dox), leads to a weak DDR with telomeric DDF formation but unstable growth arrest. As the telomeres are uncapped, there is a high susceptibility for inter-chromosomal fusions. Although we did not observe them directly, the high amount of GI following divisions is evidence of their occurrence. Cell division with dysfunctional and potentially fused telomeres leads to randomly distributed, secondary DSB that will trigger a strong DDR and a stable senescence associated growth arrest.

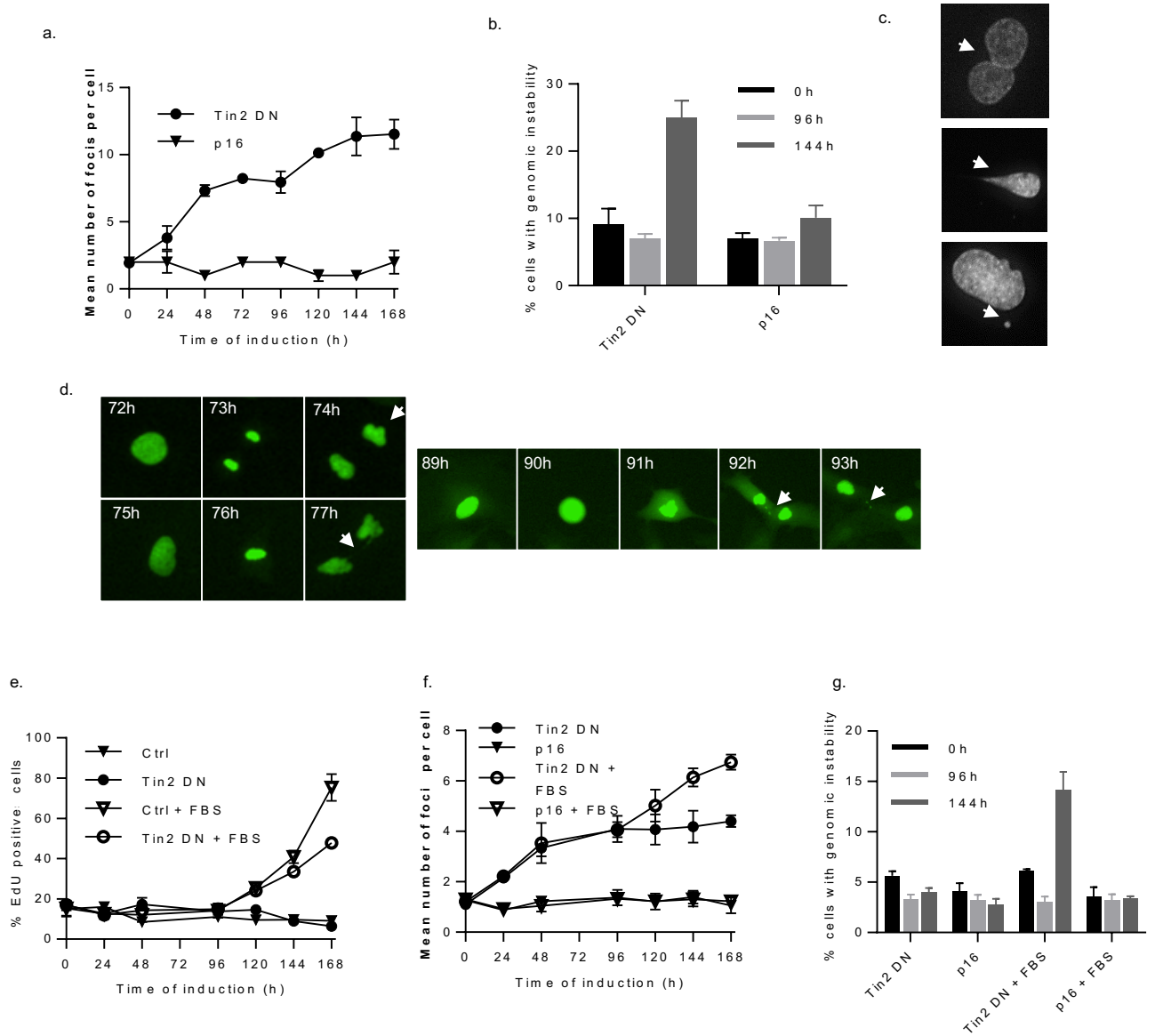
Figure S1: Tin2DN expression induces DNA damage foci formation (a) Cells were treated, or not (Ctrl), with Doxycycline and fixed after 48h to perform immunofluorescence of 53BP1. Quantification of the mean number of foci per nuclei is shown. (b) Representative picture of BJ-U TR4s Tin2DNs cells induced for 48h and immunostained for 53BP1 (red) and  $\gamma$ H2AX (green). Although we did not perform it ourselves, a previous study using the same truncated form of Tin2DN showed that the DNA damage foci were localised at the telomeres (Kim et al., 2004, 2008).

## FIGURES

**Figure 1: Tin2 DN induced growth arrest is unstable**

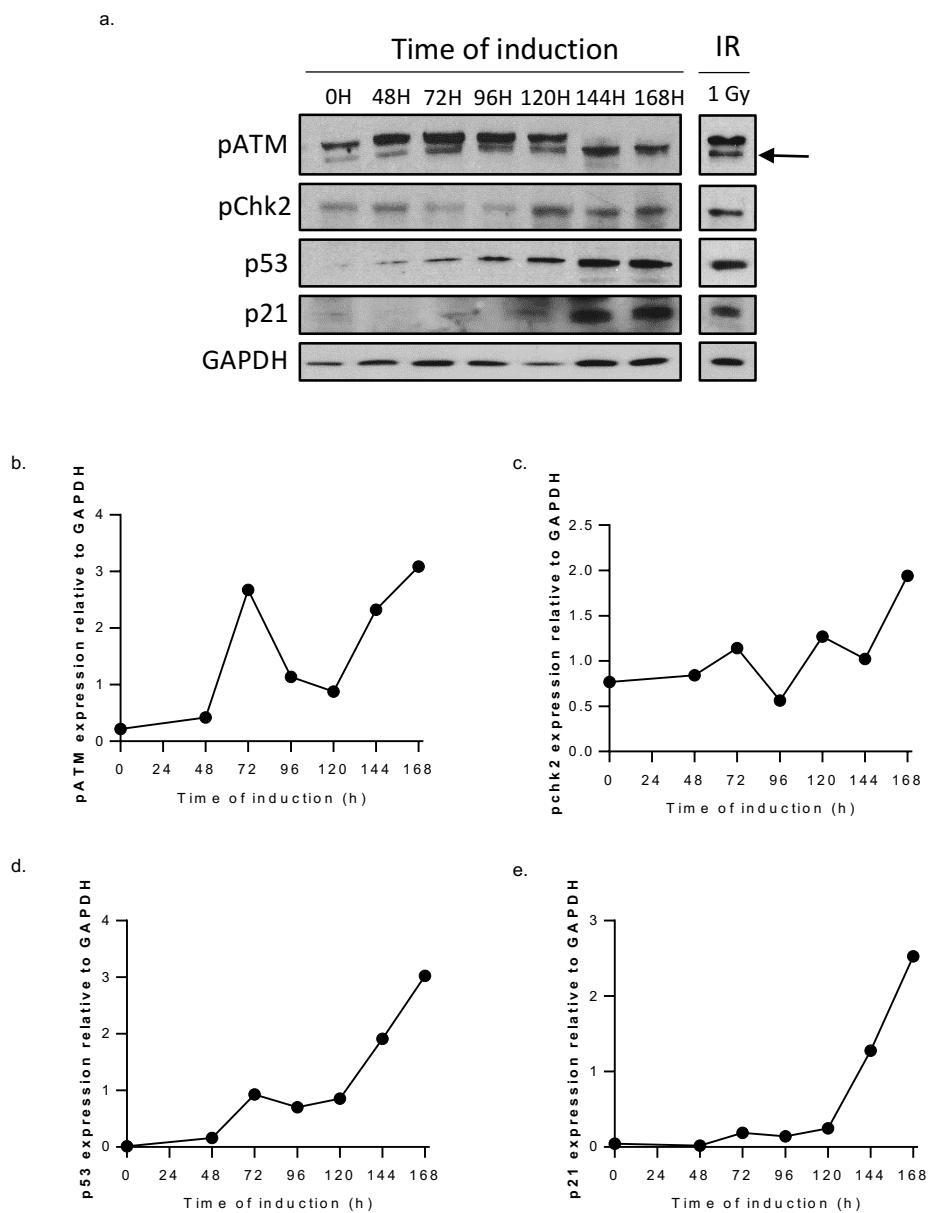


**Figure 2: Proliferation with dysfunctional telomeres causes new DSBs and genomic instability**

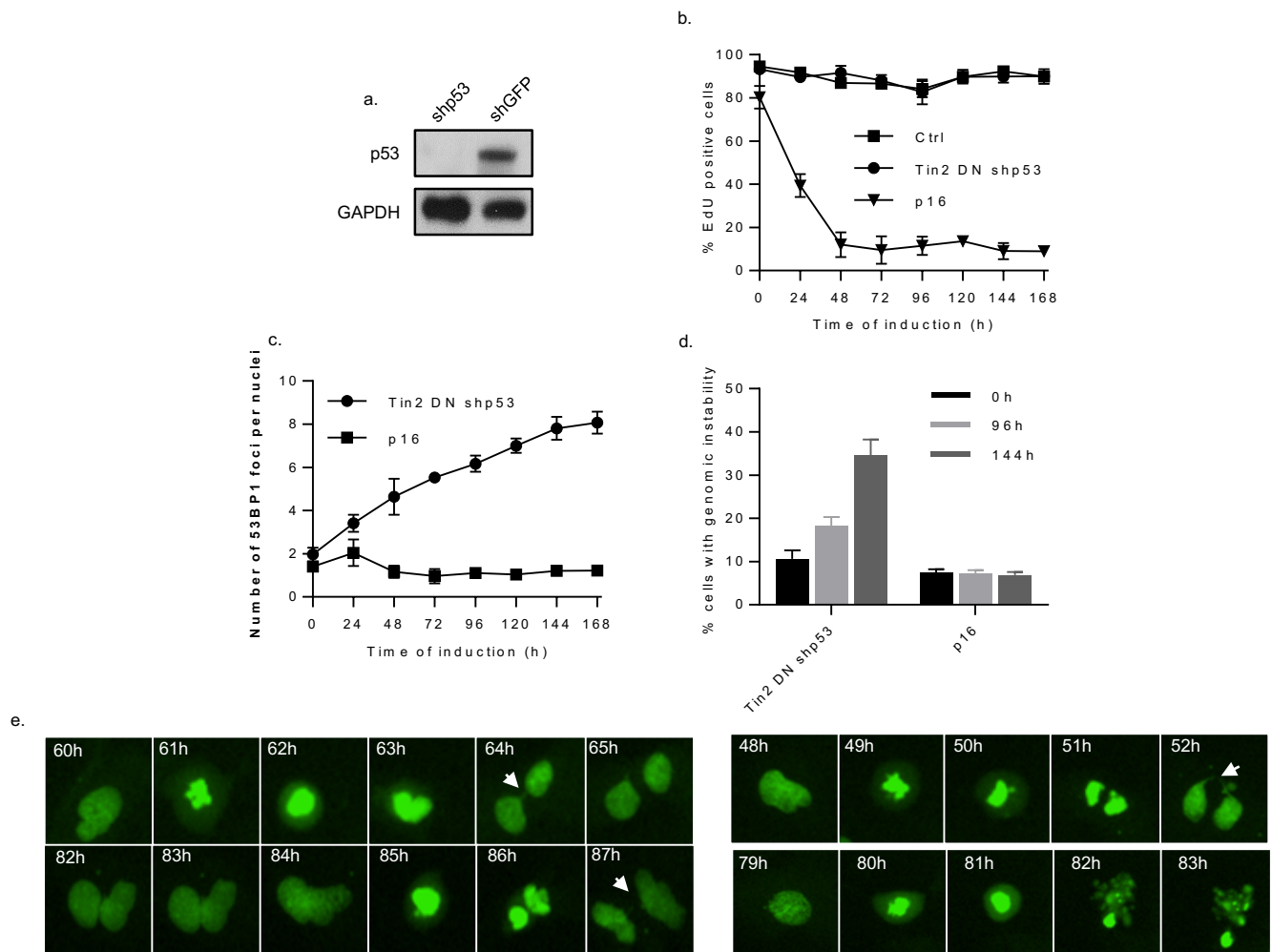




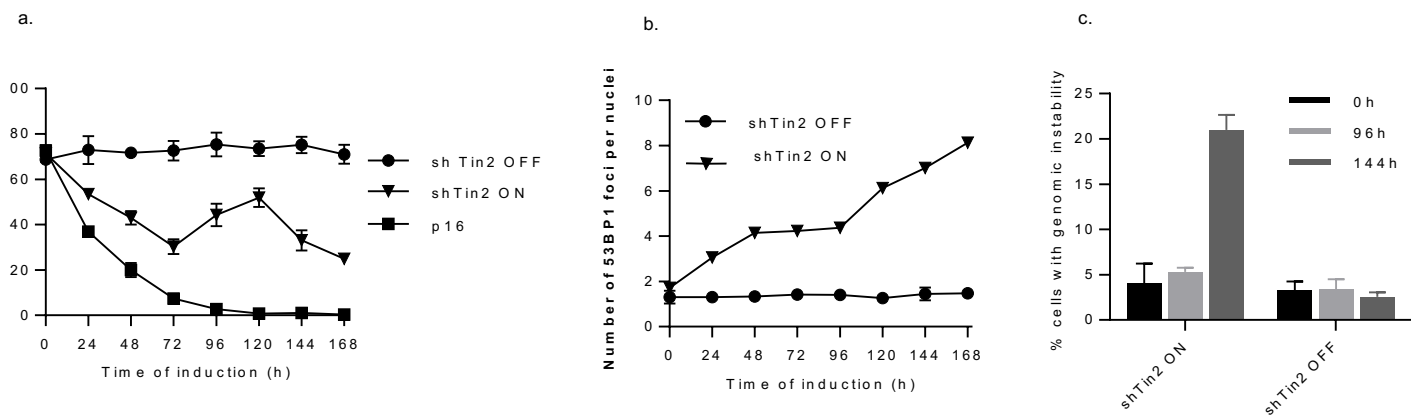
**Figure 3 : Telomeric dysfunction induces a weak DDR**



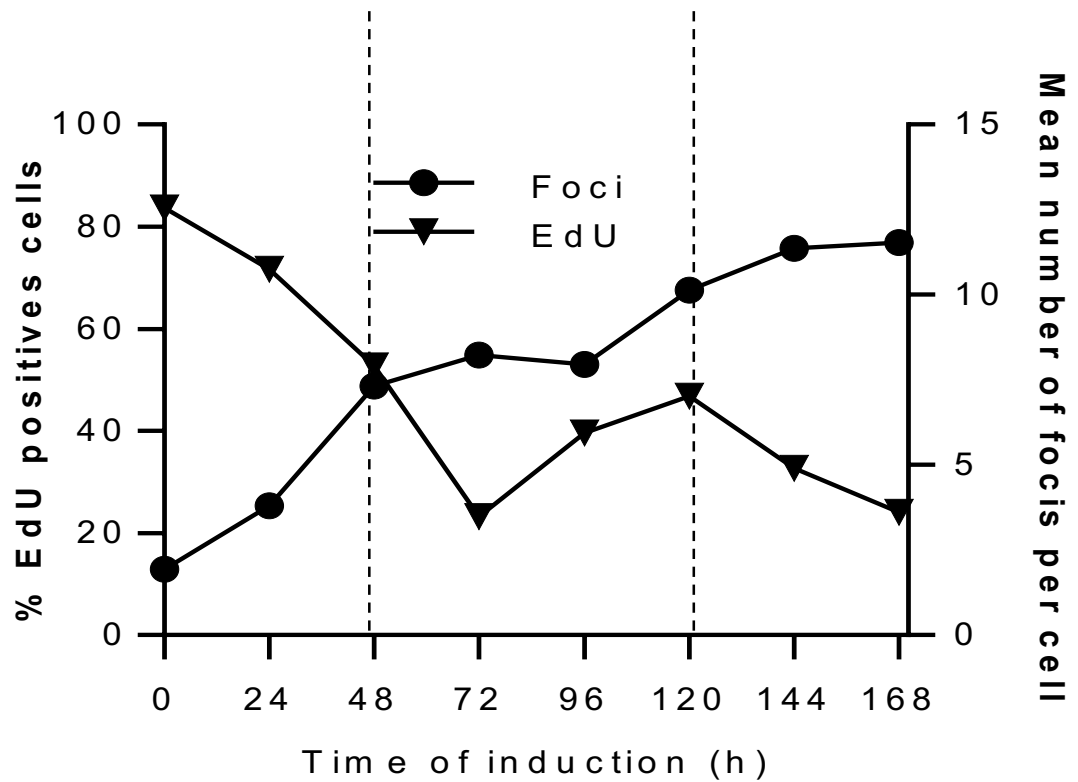
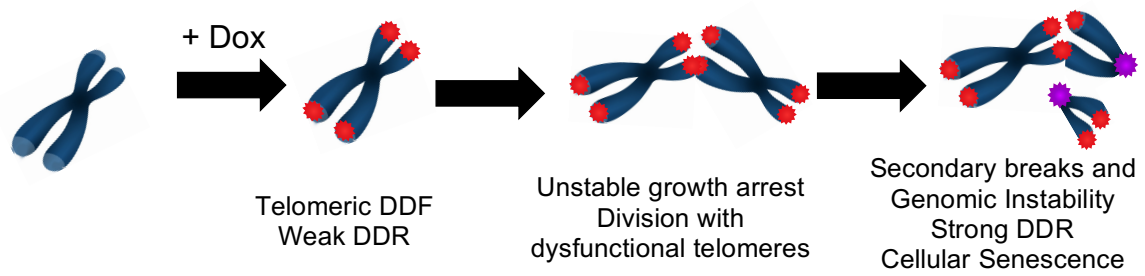
**Figure 4: Tin2 DN-induced growth arrest is p53 dependant**



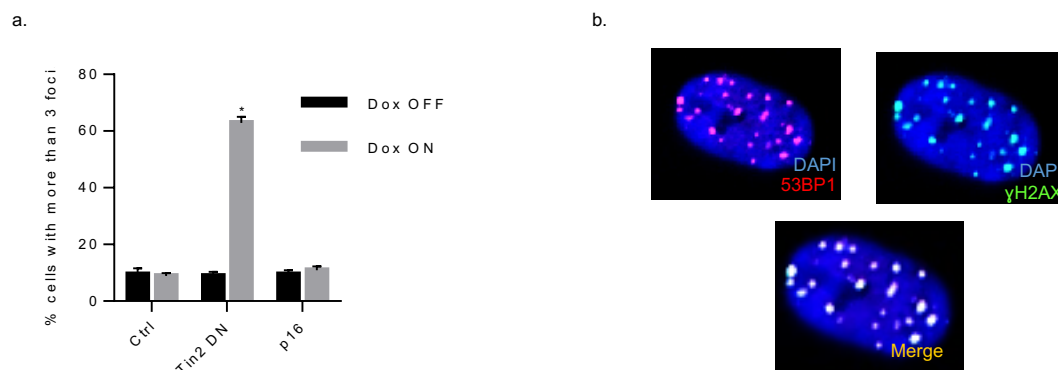
**Figure 5: Similar results are observed with an inducible shTin2**



**Figure 6: Model**



**Figure S1: Tin2DN expression induces DNA damage foci formation**



## DISCUSSION

La sénescence est un mécanisme indispensable à l'intégrité d'un organisme multicellulaire puisque, en limitant la prolifération incontrôlée des cellules, elle prévient l'apparition de mutations pouvant conduire au cancer (Collado et al., 2007; Rodier and Campisi, 2011; Shay and Roninson, 2004). Bien que la sénescence soit un processus essentiel, dans le cas de la sénescence répllicative, cela entraînera le vieillissement de l'organisme, avec les dysfonctionnements tissulaires associés qui vont augmenter sa vulnérabilité pour finalement mener à sa mort (Collado et al., 2007; Rodier and Campisi, 2011). La sénescence est tout de même bénéfique à l'organisme, puisque l'utilisation d'une forme hyperactive de p53 dans des modèles murins certes accélère le vieillissement, mais entraîne également une forte diminution de l'apparition de cancer (Tyner et al., 2002; Maier et al., 2004). L'échappement à la sénescence (répllicative ou non) est d'ailleurs un des marqueurs caractérisant les cellules cancéreuses (Kaul et al., 2012). L'étude des mécanismes d'entrée en sénescence est donc primordiale pour avoir une bonne compréhension des voies utilisées par les cellules transformées pour en échapper. Ainsi, nous avons mis en place un système nous permettant d'induire de façon spécifique et contrôlée l'ouverture de la boucle télomérique, mimant ainsi le raccourcissement massif de tous les télomères. Nous pouvons donc induire la sénescence répllicative et étudier les mécanismes de sa mise en place.

### La dysfonction télomérique seule n'induit pas d'arrêt stable de la prolifération

Les données de la littérature montraient déjà clairement que la cellule était capable de tolérer un certain nombre de télomères ouverts. En effet, les études concluaient qu'un seul

télomère ouvert ne suffit pas à instaurer un arrêt de croissance stable, mais qu'accumulation de télomères raccourcis est nécessaire à la mise en place de la sénescence (Kaul et al., 2012; Martens et al., 2000; Zou et al., 2004). Nos travaux vont encore plus loin, et montrent que, suite à une ouverture massive des télomères, la cellule ne va pas entrer directement en sénescence.

Suite à l'expression de Tin2 DN, nous observons la formation de foyers de dommages de 53BP1 (Figure S1) ainsi qu'un arrêt de la prolifération (Figure 1). Celui-ci a été observé grâce à une courbe de prolifération obtenue par Li-Cor (Figure 1a) et par EdU (Figure 1b), qui nous renseigne sur la proportion de cellules ayant traversé la phase S et donc, étant actives dans le cycle cellulaire. Nous avons comparé cet arrêt de croissance avec celui obtenu suite à l'expression de p16 dans nos cellules. Nous avons observé que, si l'expression de p16 causait un arrêt de prolifération très stable dans le temps, les cellules où Tin2 DN était induit reprenaient temporairement leur croissance après 72h. Cette différence intéressante a également été observée lors de notre analyse du cycle cellulaire par FACS. On peut voir que, suite à l'induction de p16, les cellules quittent immédiatement et définitivement le cycle cellulaire pour s'accumuler en G1, traduisant leur entrée en sénescence. À l'inverse, les cellules exprimant Tin2 DN prennent beaucoup plus de temps à sortir du cycle cellulaire, et y restent actives presque 1 semaine avant de s'accumuler en G1.

Par ailleurs, en suivant l'évolution des foyers de dommages au cours de l'induction, nous observons une augmentation du nombre de foyers de 53BP1 après la reprise temporaire de la prolifération (Figure 2a). Celle-ci s'accompagnait d'une accumulation de signes d'instabilité génomique, comme des micro-noyaux, des ponts chromosomiques ou des fusions nucléaires (Figure 2b, c). Nous avons spéculé que ces foyers de dommages secondaires étaient causés par la reprise de la prolifération : les cellules se divisent avec des télomères dysfonctionnels, donc

avec de potentielles fusions inter-chromosomiques qui, en mitose vont créer des cassures doubles brins. Pour tester cette hypothèse, nous avons cultivé nos cellules induites dans un milieu carencé en sérum, empêchant ainsi leur prolifération (Figure 2e). Dans ces conditions, nous n'avons pas observé d'augmentation dans le nombre de foyers de dommages de 53BP1 (Figure 2f), ni d'instabilités génomiques (Figure 2g), prouvant ainsi que ces derniers étaient bien causés par la division des cellules. Notons que si du sérum est ajouté au milieu à 96h, les cellules reprennent leur prolifération (Figure 2e, + FBS) et on retrouve l'apparition des cassures secondaires (Figure 2f, + FBS) et des instabilités génomiques (Figure 2g, + FBS).

Finalement, ces résultats montrent que la dysfonction télomérique va entraîner un arrêt de la prolifération, mais que celui-ci n'est pas stable dans le temps. En effet, les cellules vont se diviser malgré leurs foyers de dommages de 53BP1 et leurs télomères ouverts, ce qui va causer des cassures secondaires qui vont mener à la sénescence. Nous ne savons pas encore de façon certaine ce qui cause cette reprise de croissance, mais nous avons plusieurs pistes que nous comptons explorer dans la suite du projet. Il est intéressant de noter que le nombre de foyers de dommage supplémentaires n'est pas si élevé (on passe d'une moyenne de 4 foci par cellule à 8). Cela peut suggérer que les cellules les plus endommagées, donc avec le plus grand nombre de foyers, sont mortes par catastrophe mitotique; ou encore renforcer l'idée d'un seuil de RDA, au-delà duquel les cellules peuvent rentrer en arrêt de prolifération permanent associé à la sénescence.



## Les fusions chromosomiques à l'origine de l'échappement des points de contrôles du cycle cellulaire ?

Il se peut par exemple que les fusions inter-chromosomiques causées par l'ouverture des télomères soient interprétées par la cellule comme une forme de réparation des dommages. Pensant ses dommages réparés, la cellule retournerait dans le cycle cellulaire avec ses chromosomes fusionnés. Cette hypothèse semble plausible, mais est contredite par le fait que nous n'observons aucune diminution dans le nombre de foyers de dommages de 53BP1 avant la reprise de la prolifération, c'est-à-dire aucune résolution des foyers qui témoignerait d'une réparation par fusions.

Par ailleurs, nous avons longtemps spéculé que ces effets pouvaient être la conséquence du dominant négatif lui-même. En effet, les études de caractérisation du dominant négatif ont montré que l'expression de Tin2 DN entraînait une délocalisation de TRF2 du télomère. Dans ces conditions, Tin2 DN formait un complexe avec TRF2 qui se décrochait du télomère et restait séquestré dans le noyau. Ainsi, nous avons pensé que TRF2 ne pouvait plus inhiber les voies de RDA et donc les fusions, causant notre phénotype. Pour pallier à cela, nous avons reproduit nos expériences avec un shTin2, car l'ablation simple de son expression n'allait pas empêcher TRF2 de se lier à l'ADN. Cela reste encore à confirmer, en effectuant un co-marquage en immunofluorescence de TRF2 et des télomères. Ces conditions nous ont donné exactement les mêmes résultats, avec la même reprise de la prolifération causant des cassures secondaires et des instabilités génomiques (Figure 5). Cela suggère que la tolérance des dommages et la reprise de croissance se ferait de façon indépendante de TRF2. Nous pourrions également tester directement l'influence de TRF2, en infectant les cellules avec un shTRF2, et observer le

processus de mise en place de la sénescence suite à une ouverture télomérique causée par une perte de TRF2.

### LA RDA télomérique

L'instabilité de l'arrêt de croissance pourrait également provenir de la RDA induite par les dysfonctions télomériques. En effet, en analysant par WB l'activation de la RDA au cours de notre induction, nous avons observé plusieurs caractéristiques notables (Figure 3). Par ailleurs, nous avons comparé cette activation avec celle obtenue suite à une irradiation à 1 Gy, dose causant une trentaine de cassures. Cette quantité est suffisamment faible pour permettre une réparation des dommages et une reprise de la prolifération similaire à celle observée dans notre système. En regardant la phosphorylation d'ATM, on distingue clairement deux vagues d'activation : la première causée par les dysfonctions télomériques seules, la deuxième par les cassures secondaires (Figure 3b). Ces deux vagues semblent être d'intensité équivalente, ce qui corrobore avec les études précédentes qui décrivaient la RDA télomérique comme ATM-dépendante (Cesare et al., 2013). En revanche, si on étudie l'activation d'une des cibles d'ATM, la kinase régulatrice des points de contrôle du cycle cellulaire Chk2, on n'observe qu'un seul pic d'activation qui se situe après la reprise de la prolifération (Figure 3c). Cela suggère que, comme montré dans la littérature, la RDA télomérique est indépendante de Chk2 (Cesare et al., 2013). Enfin, si l'on continue de descendre dans la cascade, il est très surprenant d'observer que le régulateur du cycle cellulaire p53 n'est que très faiblement activé lors de la RDA primaire exclusivement télomérique (Figure 3d). En effet, seules les cassures secondaires l'activent à un niveau équivalent à celui causé par 1 Gy d'irradiation. De façon similaire, sa cible p21 ne semble

être exprimée de façon importante qu'après les dommages secondaires causés par la reprise de la prolifération (Figure 3e).

Ces résultats montrent que la dysfonction télomérique induit une RDA différente et moins intense de celle déclenchée par des cassures secondaires, possiblement intra-génomiques. De façon intéressante, une autre étude a observé que l'inactivation de Chk2 dans des cellules en sénescence répllicative leur permettait de reprendre leur prolifération (Gire, 2004). On pourrait alors spéculer que Chk2 serait impliqué dans le maintien du phénotype sénescence après les cassures secondaires engendrées par le bypass, sans intervenir dans la réponse primaire faisant suite à l'ouverture télomérique.

#### La RDA télomérique est p53 dépendante

L'activation de p53 étant étonnamment faible dans notre système, nous avons mis en cause son implication dans la RDA télomérique. Pour tester son importance, nous avons infecté nos cellules avec un shp53 et reproduit notre induction. Dans ces conditions, nous n'avons observé aucun arrêt de croissance (Figure 4b), avec une accumulation rapide et importante de dommages à l'ADN (Figure 4c) et d'instabilités génomiques (Figure 4d). Ainsi, bien que très faiblement activé, p53 semble indispensable à la RDA télomérique. Il serait intéressant de tester si un résultat similaire serait observé avec un shp21, lui aussi étant peu exprimé lors de la réponse primaire. Il est toutefois tout à fait possible que p21 ne soit pas impliqué dans cette RDA et que d'autres inhibiteurs de CDK soient responsables de l'arrêt primaire instable.

## PERSPECTIVES

Ces travaux ont permis de montrer que l'arrêt de croissance induit par la dysfonction télomérique seule n'était pas stable et ne menait donc pas directement à la sénescence. Nous ne sommes pas encore en mesure d'expliquer quelles sont les voies moléculaires impliquées dans le non-maintien de cet arrêt de croissance, mais avons déjà quelques pistes. Nous avons spéculé que, si p53 était responsable de la mise en place de l'arrêt de croissance, c'était p16 qui assurait principalement à son maintien (Beauséjour et al., 2003; Jacobs and de Lange, 2004). Plusieurs études ont montré un lien entre les voies activées par p53 et l'activation de p16, et nous avons commencé à les étudier. Pour ce faire, nous avons changé de lignées cellulaires, en remplaçant les BJ-U par des IMR90, une autre lignée de fibroblastes humains normaux. En effet, contrairement aux IMR90, les BJ-U ont leur promoteur de p16 hyperméthylé et ne peuvent par conséquent pas l'exprimer. Notre hypothèse était alors que, dans les IMR90, la dysfonction télomérique allait induire un arrêt de croissance p53 dépendant qui allait être maintenu par p16, empêchant alors la reprise de prolifération observée chez les BJ. Cependant, nos résultats préliminaires semblent invalider cette hypothèse : si l'arrêt de croissance observé est bien p53 dépendant (Vaziri and Benchimol, 1996), nous observons également une reprise de la prolifération lors de l'induction, menant aux mêmes cassures secondaires et instabilités génomiques et ce, malgré une rapide expression de p16. De plus, l'inactivation de p53 par sh dans ces cellules cause le même phénotype que dans les BJ, c'est-à-dire une prolifération constante sans arrêt de croissance, avec une accumulation de dommages et d'instabilités génomiques. Il semblerait donc que p16 ne soit impliqué ni dans le maintien de l'arrêt de croissance instauré par p53, ni dans sa mise en place en tant que remplaçant de p53. Des

conclusions similaires ont été obtenues suite à une caractérisation de la réponse moléculaire à la dysfonction télomérique, montrant alors que la RDA induite par les télomères dépendait de p53 mais pas de p16 (Herbig et al., 2004). Bien évidemment, ces résultats nécessitent une étude plus approfondie et offrent une belle perspective au projet.

L'autre hypothèse permettant d'expliquer l'instabilité de l'arrêt de croissance induit par les télomères est celle de la réparation des dommages. Dans ce modèle, les fusions chromosomiques sont interprétées par la cellule comme une réparation réussie, la poussant à retourner dans le cycle cellulaire. Pour valider cette hypothèse, nous proposons d'inhiber les fusions chromosomiques à l'aide de shARN dirigés contre différents acteurs des voies de réparation des dommages à l'ADN (HR et NHEJ) : MRE11, NBS1, 53BP1, Ku80, SUV39h1 et Ligase IV. En empêchant les fusions, on supprimera les cassures secondaires et les instabilités génomiques qui en découlent (Porro et al., 2014). A ce moment-là, il y a 2 débouchées possibles : soit les cellules vont être capables de tolérer les dommages télomériques indéfiniment et continuer leurs divisions. Soit les fusions étaient en fait interprétées comme une réparation du dommage par la cellule et leur inhibition empêche le retour à la prolifération. Dans ce modèle, la dysfonction télomérique serait bel et bien capable d'induire la sénescence à condition que les dommages télomériques ne soient jamais réparés par fusion.

La question se pose encore de la cause de cette tolérance : est-ce une faille dans le maintien de l'intégrité du génome traduisant l'incompatibilité évolutif du vieillissement, ou bien est-ce un mécanisme volontaire d'amplification des dommages ?

Finalement, une autre voie d'étude se pencherait vers l'impact des différences entre les RDA télomériques et canoniques, à la fois dans la nature des protéines activées, mais aussi dans

l'intensité de leur activation. Tout comme Karlseder, nous n'avons observé aucune activation de Chk2 suite à la dysfonction télomérique seule, nous pouvons alors nous demander d'où vient cette différence ? L'inactivation de Chk2 aurait-elle tout de même un impact sur le phénotype observé ?

Les différences entre les RDA intra-génomiques et télomériques jouent-elles un rôle ? Est-ce seulement une question d'intensité ? Si oui, combien de télomères ouverts sont nécessaires pour valoir à une cassure double brin ? Et finalement, peut-on aller jusqu'à spéculer que la cellule est capable de "classer" ses dommages par gravité, en réagissant différemment en fonction de la région du chromosome a été endommagée (ex : euchromatine vs hétérochromatine) ?

Ce projet, en plus de proposer un nouveau modèle d'entrée en sénescence répllicative offre de nombreuses pistes réflexions concernant la RDA et le destin cellulaire.

## CONCLUSION

La sénescence est un phénomène physiologique inhérent à l'organisme. Son rôle premier de protecteur de l'intégrité du génome est particulièrement vérifié dans le cas de la sénescence répllicative. En effet, elle définit le potentiel prolifératif d'une cellule en forçant son arrêt avant une trop grande accumulation de dommages qui pourrait mener à des mutations et une transformation néoplasique. Le dogme classique propose que la sénescence répllicative soit causée par une accumulation de télomères raccourcis qui déclencherait un RDA et mènerait à l'arrêt de croissance permanent associé à la sénescence. Des observations regroupées depuis différentes études ont mis à jour l'idée d'une tolérance des dommages à l'ADN télomérique,

puisque les cellules sont capables de se diviser suite au raccourcissement successif de plusieurs télomères. Nous avons voulu tester l'étendue de cette tolérance aux dommages télomériques en induisant l'ouverture massive de toutes les boucles télomériques, révélant ainsi l'extrémité des chromosomes comme dommages à l'ADN. De façon surprenante, cette dysfonction télomérique majeure n'a pas suffi à induire un arrêt de croissance stable, puisque les cellules sont réentrées dans le cycle cellulaire après un court arrêt de prolifération et ce, malgré leurs télomères ouverts. Cette division a causé de nouvelles cassures secondaires ainsi que des instabilités génomiques qui semblent être la cause de l'arrêt de croissance final.

Nos travaux offrent un nouveau modèle où la sénescence n'est pas induite directement par les dommages télomériques, mais plutôt par une amplification des dommages causée par une reprise de la prolifération en présence de télomères dysfonctionnels. Cela permettrait à la cellule d'assurer la robustesse de l'arrêt de croissance, puisque son génome aurait accumulé une quantité trop importante de dommages pour pouvoir ré-entrer dans le cycle cellulaire. Cette conclusion peut sembler surprenante, voire contre intuitive de prime abord, mais plusieurs études indépendantes apportent des éléments qui rejoignent notre analyse. Par ailleurs, cela ne serait pas le premier exemple d'une altération du génome associée à la sénescence, puisque les SAHF ou les DNA SCARS sont déjà des marqueurs jouant un rôle dans le maintien de l'arrêt de croissance permanent (Narita et al., 2003; Rodier et al., 2011). Mis en commun avec les précédentes études, nos recherches permettent ainsi de comprendre un peu mieux les mécanismes d'entrée en sénescence suite à une dysfonction télomérique.

## Bibliographie

- Alessio, N., S. Del Gaudio, S. Capasso, G. Di Bernardo, S. Cappabianca, M. Cipollaro, G. Peluso, and U. Galderisi. 2014. Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process. *Oncotarget*. 6:8155–8166.
- Armanios, M.Y., J.J.-L. Chen, J.D. Cogan, J.K. Alder, R.G. Ingersoll, C. Markin, W.E. Lawson, M. Xie, I. Vulto, J.A. Phillips, P.M. Lansdorp, C.W. Greider, and J.E. Loyd. 2007. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 356:1317–1326. doi:10.1056/NEJMoa066157.
- Artandi, S.E., and R.A. DePinho. 2000. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:39–46.
- Asaithamby, A., and D.J. Chen. 2009. Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose  $\gamma$ -irradiation. *Nucleic Acids Res.* 37:3912–3923. doi:10.1093/nar/gkp237.
- Bae, N.S., and P. Baumann. 2007. A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends. *Mol. Cell.* 26:323–334. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.023.
- Bahassi, E.M. 2011. Polo-like kinases and DNA damage checkpoint: beyond the traditional mitotic functions. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ. 236:648–657. doi:10.1258/ebm.2011.011011.
- Bartkova, J., N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L.-V.F. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V.C. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C.L. Andersen, L. Dyrskjot, T. Ørntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T.D. Halazonetis, J. Bartek, and V.G. Gorgoulis. 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 444:633–637. doi:10.1038/nature05268.
- Bavik, C., I. Coleman, J.P. Dean, B. Knudsen, S. Plymate, and P.S. Nelson. 2006. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res.* 66:794–802. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1716.
- Beauséjour, C.M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S.W. Lowe, P. Yaswen, and J. Campisi. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22:4212–4222. doi:10.1093/emboj/cdg417.
- Benn, P.A. 1976. Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. *Am. J. Hum. Genet.* 28:465–473.



- Bianchi, A., S. Smith, L. Chong, P. Elias, and T. de Lange. 1997. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J.* 16:1785–1794. doi:10.1093/emboj/16.7.1785.
- Blagosklonny, M.V. 2012. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging.* 4:159–165.
- Broccoli, D., A. Smogorzewska, L. Chong, and T. de Lange. 1997. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* 17:231–235. doi:10.1038/ng1097-231.
- Bryan, T.M., A. Englezou, J. Gupta, S. Bacchetti, and R.R. Reddel. 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 14:4240–4248.
- Buck, S.B., J. Bradford, K.R. Gee, B.J. Agnew, S.T. Clarke, and A. Salic. 2008. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *BioTechniques.* 44:927–929. doi:10.2144/000112812.
- Campeau, E., V.E. Ruhl, F. Rodier, C.L. Smith, B.L. Rahmberg, J.O. Fuss, J. Campisi, P. Yaswen, P.K. Cooper, and P.D. Kaufman. 2009. A Versatile Viral System for Expression and Depletion of Proteins in Mammalian Cells. *PLoS ONE.* 4. doi:10.1371/journal.pone.0006529.
- Canudas, S., B.R. Houghtaling, M. Bhanot, G. Sasa, S.A. Savage, A.A. Bertuch, and S. Smith. 2011. A role for heterochromatin protein 1 at human telomeres. *Genes Dev.* 25:1807–1819. doi:10.1101/gad.17325211.
- Carroll, K.A., and H. Ly. 2009. Telomere Dysfunction in Human Diseases: The Long and Short of It! *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2:528–543.
- Celli, G.B., E.L. Denchi, and T. de Lange. 2006. Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nat. Cell Biol.* 8:885–890. doi:10.1038/ncb1444.
- Cesare, A.J., M.T. Hayashi, L. Crabbe, and J. Karlseder. 2013. The telomere deprotection response is functionally distinct from the genomic DNA damage response. *Mol. Cell.* 51:141–155. doi:10.1016/j.molcel.2013.06.006.
- Cesare, A.J., and J. Karlseder. 2012. A three-state model of telomere control over human proliferative boundaries. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24:731–738. doi:10.1016/j.ceb.2012.08.007.
- Chang, D.J., and K.A. Cimprich. 2009. DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat. Chem. Biol.* 5:82–90. doi:10.1038/nchembio.139.

- Chen, Q., A. Fischer, J.D. Reagan, L.J. Yan, and B.N. Ames. 1995. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:4337–4341.
- Chen, Q.M., V.C. Tu, J. Catania, M. Burton, O. Toussaint, and T. Dilley. 2000. Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 22):4087–4097.
- Chen, Z., L.C. Trotman, D. Shaffer, H.-K. Lin, Z.A. Dotan, M. Niki, J.A. Koutcher, H.I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, C. Cordon-Cardo, and P.P. Pandolfi. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature.* 436:725–730. doi:10.1038/nature03918.
- Cheung, A.L.M., and W. Deng. 2008. Telomere dysfunction, genome instability and cancer. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13:2075–2090.
- Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano. 2007. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell.* 130:223–233. doi:10.1016/j.cell.2007.07.003.
- Coppé, J.-P., P.-Y. Desprez, A. Krtolica, and J. Campisi. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* 5:99–118. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144.
- Coppé, J.-P., F. Rodier, C.K. Patil, A. Freund, P.-Y. Desprez, and J. Campisi. 2011. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J. Biol. Chem.* 286:36396–36403. doi:10.1074/jbc.M111.257071.
- Cosme-Blanco, W., M.-F. Shen, A.J.F. Lazar, S. Pathak, G. Lozano, A.S. Multani, and S. Chang. 2007. Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Rep.* 8:497–503. doi:10.1038/sj.embor.7400937.
- Decker, M.L., E. Chavez, I. Vulto, and P.M. Lansdorp. 2009. Telomere length in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Mech. Ageing Dev.* 130:377–383. doi:10.1016/j.mad.2009.03.001.
- Denchi, E.L., and T. de Lange. 2007. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature.* 448:1068–1071. doi:10.1038/nature06065.
- Devasagayam, T.P.A., J.C. Tilak, K.K. Bloor, K.S. Sane, S.S. Ghaskadbi, and R.D. Lele. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India.* 52:794–804.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre', P.G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P.G. Pelicci, and F. d'Adda di

- Fagagna. 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 444:638–642. doi:10.1038/nature05327.
- Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, and O. Pereira-Smith. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9363–9367.
- Drummond-Barbosa, D. 2008. Stem cells, their niches and the systemic environment: an aging network. *Genetics*. 180:1787–1797. doi:10.1534/genetics.108.098244.
- Dumont, P., M. Burton, Q.M. Chen, E.S. Gonos, C. Frippiat, J.B. Mazarati, F. Eliaers, J. Remacle, and O. Toussaint. 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic. Biol. Med.* 28:361–373.
- Estey, E., and H. Döhner. 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* 368:1894–1907. doi:10.1016/S0140-6736(06)69780-8.
- d’Adda di Fagagna, F., P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, and S.P. Jackson. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 426:194–198. doi:10.1038/nature02118.
- Feldser, D.M., and C.W. Greider. 2007. Short Telomeres Limit Tumor Progression In Vivo by Inducing Senescence. *Cancer Cell*. 11:461–469. doi:10.1016/j.ccr.2007.02.026.
- Feng, J., W.D. Funk, S.S. Wang, S.L. Weinrich, A.A. Avilion, C.P. Chiu, R.R. Adams, E. Chang, R.C. Allsopp, and J. Yu. 1995. The RNA component of human telomerase. *Science*. 269:1236–1241.
- Fenton, M., H.-L. Huang, Y. Hong, E. Hawe, D.J. Kurz, and J.D. Erusalimsky. 2004. Early atherogenesis in senescence-accelerated mice. *Exp. Gerontol.* 39:115–122.
- Frank, A.K., D.C. Tran, R.W. Qu, B.A. Stohr, D.J. Segal, and L. Xu. 2015. The Shelterin TIN2 Subunit Mediates Recruitment of Telomerase to Telomeres. *PLOS Genet.* 11:e1005410. doi:10.1371/journal.pgen.1005410.
- Fumagalli, M., F. Rossiello, M. Clerici, S. Barozzi, D. Cittaro, J.M. Kaplunov, G. Bucci, M. Dobrev, V. Matti, C.M. Beausejour, U. Herbig, M.P. Longhese, and F. d’Adda di Fagagna. 2012. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat. Cell Biol.* 14:355–365. doi:10.1038/ncb2466.
- Galgoczy, D.J., and D.P. Toczyski. 2001. Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 21:1710–1718. doi:10.1128/MCB.21.5.1710-1718.2001.
- Ganem, N.J., and D. Pellman. 2012. Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *J. Cell Biol.* 199:871–881. doi:10.1083/jcb.201210040.

- Garcia, C.K., W.E. Wright, and J.W. Shay. 2007. Human diseases of telomerase dysfunction: insights into tissue aging. *Nucleic Acids Res.* 35:7406–7416. doi:10.1093/nar/gkm644.
- Gire, V. 2004. Dysfunctional telomeres at senescence signal cell cycle arrest via Chk2. *Cell Cycle Georget. Tex.* 3:1217–1220. doi:10.4161/cc.3.10.1167.
- Gire, V., P. Roux, D. Wynford-Thomas, J.-M. Brondello, and V. Dulic. 2004. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J.* 23:2554–2563. doi:10.1038/sj.emboj.7600259.
- Griffith, J.D., L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, and T. de Lange. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell.* 97:503–514.
- Gross, T.J., and G.W. Hunninghake. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 345:517–525. doi:10.1056/NEJMra003200.
- Guo, X., Y. Deng, Y. Lin, W. Cosme-Blanco, S. Chan, H. He, G. Yuan, E.J. Brown, and S. Chang. 2007. Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis. *EMBO J.* 26:4709–4719. doi:10.1038/sj.emboj.7601893.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 144:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 345:458–460. doi:10.1038/345458a0.
- Harrington, L., T. McPhail, V. Mar, W. Zhou, R. Oulton, M.B. Bass, I. Arruda, and M.O. Robinson. 1997. A mammalian telomerase-associated protein. *Science.* 275:973–977.
- Hayashi, M.T., and J. Karlseder. 2013. DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. *Oncogene.* 32:4593–4601. doi:10.1038/onc.2012.615.
- Hayflick, L., and P.S. Moorhead. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25:585–621.
- He, H., A.S. Multani, W. Cosme-Blanco, H. Tahara, J. Ma, S. Pathak, Y. Deng, and S. Chang. 2006. POT1b protects telomeres from end-to-end chromosomal fusions and aberrant homologous recombination. *EMBO J.* 25:5180–5190. doi:10.1038/sj.emboj.7601294.
- Heiss, N.S., S.W. Knight, T.J. Vulliamy, S.M. Klauck, S. Wiemann, P.J. Mason, A. Poustka, and I. Dokal. 1998. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat. Genet.* 19:32–38. doi:10.1038/ng0598-32.

- Hemann, M.T., M.A. Strong, L.-Y. Hao, and C.W. Greider. 2001. The Shortest Telomere, Not Average Telomere Length, Is Critical for Cell Viability and Chromosome Stability. *Cell*. 107:67–77. doi:10.1016/S0092-8674(01)00504-9.
- Henson, J.D., Y. Cao, L.I. Huschtscha, A.C. Chang, A.Y.M. Au, H.A. Pickett, and R.R. Reddel. 2009. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat. Biotechnol.* 27:1181–1185. doi:10.1038/nbt.1587.
- Herbig, U., W.A. Jobling, B.P.C. Chen, D.J. Chen, and J.M. Sedivy. 2004. Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21CIP1, but Not p16INK4a. *Mol. Cell*. 14:501–513. doi:10.1016/S1097-2765(04)00256-4.
- Hockemeyer, D., W. Palm, T. Else, J.-P. Daniels, K.K. Takai, J.Z.-S. Ye, C.E. Keegan, T. de Lange, and G.D. Hammer. 2007. Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:754–761. doi:10.1038/nsmb1270.
- Hockemeyer, D., A.J. Sfeir, J.W. Shay, W.E. Wright, and T. de Lange. 2005. POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *EMBO J.* 24:2667–2678. doi:10.1038/sj.emboj.7600733.
- Hofer, A.C., R.T. Tran, O.Z. Aziz, W. Wright, G. Novelli, J. Shay, and M. Lewis. 2005. Shared phenotypes among segmental progeroid syndromes suggest underlying pathways of aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 60:10–20.
- Hornebeck, W., and F.X. Maquart. 2003. Proteolyzed matrix as a template for the regulation of tumor progression. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie.* 57:223–230.
- Jackson, S.P., and J. Bartek. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 461:1071–1078. doi:10.1038/nature08467.
- Jacobs, J.J.L., and T. de Lange. 2004. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol. CB.* 14:2302–2308. doi:10.1016/j.cub.2004.12.025.
- Jun, J.-I., and L.F. Lau. 2010. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.* 12:676–685. doi:10.1038/ncb2070.
- Kang, M.K., A. Kameta, K.-H. Shin, M.A. Baluda, H.-R. Kim, and N.-H. Park. 2003. Senescence-associated genes in normal human oral keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 287:272–281.
- Karlseder, J., D. Broccoli, Y. Dai, S. Hardy, and T. de Lange. 1999. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science*. 283:1321–1325.

- Kaul, Z., A.J. Cesare, L.I. Huschtscha, A.A. Neumann, and R.R. Reddel. 2012. Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells. *EMBO Rep.* 13:52–59. doi:10.1038/embor.2011.227.
- Kendellen, M.F., K.S. Barrientos, and C.M. Counter. 2009. POT1 Association with TRF2 Regulates Telomere Length. *Mol. Cell. Biol.* 29:5611–5619. doi:10.1128/MCB.00286-09.
- Kim, N.W., M.A. Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, and J.W. Shay. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 266:2011–2015.
- Kim, S., C. Beausejour, A.R. Davalos, P. Kaminker, S.-J. Heo, and J. Campisi. 2004. TIN2 Mediates Functions of TRF2 at Human Telomeres. *J. Biol. Chem.* 279:43799–43804. doi:10.1074/jbc.M408650200.
- Kim, S., A.R. Davalos, S.-J. Heo, F. Rodier, Y. Zou, C. Beausejour, P. Kaminker, S.M. Yannoni, and J. Campisi. 2008. Telomere dysfunction and cell survival: roles for distinct TIN2-containing complexes. *J. Cell Biol.* 181:447–460. doi:10.1083/jcb.200710028.
- Kipling, D., and H.J. Cooke. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature.* 347:400–402. doi:10.1038/347400a0.
- Krizhanovsky, V., M. Yon, R.A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender, and S.W. Lowe. 2008. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell.* 134:657–667. doi:10.1016/j.cell.2008.06.049.
- Ksiazek, K., A. Jörres, and J. Witowski. 2008. Senescence induces a proangiogenic switch in human peritoneal mesothelial cells. *Rejuvenation Res.* 11:681–683. doi:10.1089/rej.2008.0736.
- Lange, T. de. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 19:2100–2110. doi:10.1101/gad.1346005.
- de Lange, T., L. Shiue, R.M. Myers, D.R. Cox, S.L. Naylor, A.M. Killery, and H.E. Varmus. 1990. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* 10:518–527.
- Lee, B.Y., J.A. Han, J.S. Im, A. Morrone, K. Johung, E.C. Goodwin, W.J. Kleijer, D. DiMaio, and E.S. Hwang. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell.* 5:187–195. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x.
- Levy, M.Z., R.C. Allsopp, A.B. Futcher, C.W. Greider, and C.B. Harley. 1992. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 225:951–960.

- Lingner, J., J.P. Cooper, and T.R. Cech. 1995. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science*. 269:1533–1534. doi:10.1126/science.7545310.
- Liu, D., and P.J. Hornsby. 2007. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res*. 67:3117–3126. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3452.
- Liu, D., M.S. O'Connor, J. Qin, and Z. Songyang. 2004. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J. Biol. Chem*. 279:51338–51342. doi:10.1074/jbc.M409293200.
- Londoño-Vallejo, J.A., H. Der-Sarkissian, L. Cazes, S. Bacchetti, and R.R. Reddel. 2004. Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res*. 64:2324–2327.
- Londoño-Vallejo, J.A., H. DerSarkissian, L. Cazes, and G. Thomas. 2001. Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans. *Nucleic Acids Res*. 29:3164–3171.
- Maier, B., W. Gluba, B. Bernier, T. Turner, K. Mohammad, T. Guise, A. Sutherland, M. Thorner, and H. Scoble. 2004. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev*. 18:306–319. doi:10.1101/gad.1162404.
- Makarov, V.L., Y. Hirose, and J.P. Langmore. 1997. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*. 88:657–666.
- Mallette, F.A., M.-F. Gaumont-Leclerc, and G. Ferbeyre. 2007. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev*. 21:43–48. doi:10.1101/gad.1487307.
- Mao, Z., Z. Ke, V. Gorbunova, and A. Seluanov. 2012. Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. *Aging*. 4:431–435.
- Martens, U.M., E.A. Chavez, S.S. Poon, C. Schmoor, and P.M. Lansdorp. 2000. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp. Cell Res*. 256:291–299. doi:10.1006/excr.2000.4823.
- Martens, U.M., J.M. Zijlmans, S.S. Poon, W. Dragowska, J. Yui, E.A. Chavez, R.K. Ward, and P.M. Lansdorp. 1998. Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat. Genet*. 18:76–80. doi:10.1038/ng0198-018.
- Maser, R.S., and R.A. DePinho. 2002. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science*. 297:565–569. doi:10.1126/science.297.5581.565.
- Maya-Mendoza, A., J. Ostrakova, M. Kosar, A. Hall, P. Duskova, M. Mistrik, J.M. Merchut-Maya, Z. Hodny, J. Bartkova, C. Christensen, and J. Bartek. 2015. Myc and Ras

- oncogenes engage different energy metabolism programs and evoke distinct patterns of oxidative and DNA replication stress. *Mol. Oncol.* 9:601–616. doi:10.1016/j.molonc.2014.11.001.
- McClintock, B. 1939. The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 25:405–416.
- Meyerson, M., C.M. Counter, E.N. Eaton, L.W. Ellisen, P. Steiner, S.D. Caddle, L. Ziaugra, R.L. Beijersbergen, M.J. Davidoff, Q. Liu, S. Bacchetti, D.A. Haber, and R.A. Weinberg. 1997. hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization. *Cell.* 90:785–795. doi:10.1016/S0092-8674(00)80538-3.
- Mitchell, J.R., E. Wood, and K. Collins. 1999. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature.* 402:551–555. doi:10.1038/990141.
- Moyzis, R.K., J.M. Buckingham, L.S. Cram, M. Dani, L.L. Deaven, M.D. Jones, J. Meyne, R.L. Ratliff, and J.R. Wu. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:6622–6626.
- Muller, F.L., M.S. Lustgarten, Y. Jang, A. Richardson, and H. Van Remmen. 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* 43:477–503. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034.
- Muñoz-Espín, D., M. Cañamero, A. Maraver, G. Gómez-López, J. Contreras, S. Murillo-Cuesta, A. Rodríguez-Baeza, I. Varela-Nieto, J. Ruberte, M. Collado, and M. Serrano. 2013. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell.* 155:1104–1118. doi:10.1016/j.cell.2013.10.019.
- Nakamura, T.M., G.B. Morin, K.B. Chapman, S.L. Weinrich, W.H. Andrews, J. Lingner, C.B. Harley, and T.R. Cech. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science.* 277:955–959.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A.W. Lin, S.A. Hearn, D.L. Spector, G.J. Hannon, and S.W. Lowe. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 113:703–716.
- Neumann, A.A., and R.R. Reddel. 2002. Telomere maintenance and cancer? look, no telomerase. *Nat. Rev. Cancer.* 2:879–884. doi:10.1038/nrc929.
- Palm, W., and T. de Lange. 2008. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 42:301–334. doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130350.
- Parrinello, S., J.-P. Coppe, A. Krtolica, and J. Campisi. 2005. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.* 118:485–496. doi:10.1242/jcs.01635.



- Porro, A., S. Feuerhahn, J. Delafontaine, H. Riethman, J. Rougemont, and J. Lingner. 2014. Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. *Nat. Commun.* 5:5379. doi:10.1038/ncomms6379.
- Potts, P.R., and H. Yu. 2007. The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:581–590. doi:10.1038/nsmb1259.
- Ribes-Zamora, A., S.M. Indiviglio, I. Mihalek, C.L. Williams, and A.A. Bertuch. 2013. TRF2 Interaction with Ku Heterotetramerization Interface Gives Insight into c-NHEJ Prevention at Human Telomeres. *Cell Rep.* 5:194–206. doi:10.1016/j.celrep.2013.08.040.
- Rodier, F., and J. Campisi. 2011. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* 192:547–556. doi:10.1083/jcb.201009094.
- Rodier, F., J.-P. Coppé, C.K. Patil, W.A.M. Hoeijmakers, D.P. Muñoz, S.R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A.R. Davalos, and J. Campisi. 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* 11:973–979. doi:10.1038/ncb1909.
- Rodier, F., D.P. Muñoz, R. Teachenor, V. Chu, O. Le, D. Bhaumik, J.-P. Coppé, E. Campeau, C.M. Beauséjour, S.-H. Kim, A.R. Davalos, and J. Campisi. 2011. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci.* 124:68–81. doi:10.1242/jcs.071340.
- Saksela, E., and P.S. Moorhead. 1963. ANEUPLOIDY IN THE DEGENERATIVE PHASE OF SERIAL CULTIVATION OF HUMAN CELL STRAINS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 50:390–395.
- Sarthy, J., N.S. Bae, J. Scrafford, and P. Baumann. 2009. Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres. *EMBO J.* 28:3390–3399. doi:10.1038/emboj.2009.275.
- Savage, S.A., R.T. Calado, Z.-T. Xin, H. Ly, N.S. Young, and S.J. Chanock. 2006. Genetic variation in telomeric repeat binding factors 1 and 2 in aplastic anemia. *Exp. Hematol.* 34:664–671. doi:10.1016/j.exphem.2006.02.008.
- Savage, S.A., N. Giri, G.M. Baerlocher, N. Orr, P.M. Lansdorp, and B.P. Alter. 2008. TINF2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita. *Am. J. Hum. Genet.* 82:501–509. doi:10.1016/j.ajhg.2007.10.004.
- Schafer, A.I. 2006. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood.* 107:4214–4222. doi:10.1182/blood-2005-08-3526.
- Schmitt, C.A., J.S. Fridman, M. Yang, E. Baranov, R.M. Hoffman, and S.W. Lowe. 2002. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell.* 1:289–298.

- Serrano, M. 2007. Cancer Regression by Senescence. *N. Engl. J. Med.* 356:1996–1997. doi:10.1056/NEJMcibr071461.
- Sfeir, A.J., W. Chai, J.W. Shay, and W.E. Wright. 2005. Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes. *Mol. Cell.* 18:131–138. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.035.
- Sharpless, N.E., and R.A. DePinho. 2004. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J. Clin. Invest.* 113:160–168. doi:10.1172/JCI20761.
- Shay, J.W., and I.B. Roninson. 2004. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene.* 23:2919–2933. doi:10.1038/sj.onc.1207518.
- Sherwood, S.W., D. Rush, J.L. Ellsworth, and R.T. Schimke. 1988. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:9086–9090.
- Shiloh, Y. 1997. ATAXIA-TELANGIECTASIA AND THE NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME: Related Disorders But Genes Apart. *Annu. Rev. Genet.* 31:635–662. doi:10.1146/annurev.genet.31.1.635.
- Smogorzewska, A., J. Karlseder, H. Holtgreve-Grez, A. Jauch, and T. de Lange. 2002. DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr. Biol. CB.* 12:1635–1644.
- Smogorzewska, A., and T. de Lange. 2002. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* 21:4338–4348.
- van Steensel, B., A. Smogorzewska, and T. de Lange. 1998. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 92:401–413.
- Storer, M., A. Mas, A. Robert-Moreno, M. Pecoraro, M.C. Ortells, V. Di Giacomo, R. Yosef, N. Pilpel, V. Krizhanovsky, J. Sharpe, and W.M. Keyes. 2013. Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell.* 155:1119–1130. doi:10.1016/j.cell.2013.10.041.
- Swift, L.H., and R.M. Golsteyn. 2014. Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15:3403–3431. doi:10.3390/ijms15033403.
- Thompson, K.V.A., and R. Holliday. 1975. Chromosome changes during the in vitro ageing of MRC-5 human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 96:1–6. doi:10.1016/S0014-4827(75)80029-2.
- Tsakiri, K.D., J.T. Cronkhite, P.J. Kuan, C. Xing, G. Raghu, J.C. Weissler, R.L. Rosenblatt, J.W. Shay, and C.K. Garcia. 2007. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations

- in telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:7552–7557. doi:10.1073/pnas.0701009104.
- Tyner, S.D., S. Venkatachalam, J. Choi, S. Jones, N. Ghebranious, H. Igelmann, X. Lu, G. Soron, B. Cooper, C. Brayton, S.H. Park, T. Thompson, G. Karsenty, A. Bradley, and L.A. Donehower. 2002. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 415:45–53. doi:10.1038/415045a.
- Van Raamsdonk, J.M., and S. Hekimi. 2009. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 5:e1000361. doi:10.1371/journal.pgen.1000361.
- Vasile, E., Y. Tomita, L.F. Brown, O. Kocher, and H.F. Dvorak. 2001. Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15:458–466. doi:10.1096/fj.00-0051com.
- Vaziri, H., and S. Benchimol. 1996. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: The telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp. Gerontol.* 31:295–301. doi:10.1016/0531-5565(95)02025-X.
- Veldman, T., K.T. Etheridge, and C.M. Counter. 2004. Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype. *Curr. Biol. CB.* 14:2264–2270. doi:10.1016/j.cub.2004.12.031.
- Walne, A.J., T. Vulliamy, R. Beswick, M. Kirwan, and I. Dokal. 2008. TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. *Blood*. 112:3594–3600. doi:10.1182/blood-2008-05-153445.
- Wang, F., and M. Lei. 2011. Human telomere POT1-TPP1 complex and its role in telomerase activity regulation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 735:173–187. doi:10.1007/978-1-61779-092-8\_17.
- Wang, F., E.R. Podell, A.J. Zaug, Y. Yang, P. Baciú, T.R. Cech, and M. Lei. 2007. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*. 445:506–510. doi:10.1038/nature05454.
- Wang, R.C., A. Smogorzewska, and T. de Lange. 2004. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell*. 119:355–368. doi:10.1016/j.cell.2004.10.011.
- Waters, L.S., B.K. Minesinger, M.E. Wiltrout, S. D’Souza, R.V. Woodruff, and G.C. Walker. 2009. Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 73:134–154. doi:10.1128/MMBR.00034-08.

- Wiemann, S.U., A. Satyanarayana, M. Tsahuridu, H.L. Tillmann, L. Zender, J. Klempnauer, P. Flemming, S. Franco, M.A. Blasco, M.P. Manns, and K.L. Rudolph. 2002. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16:935–942. doi:10.1096/fj.01-0977com.
- Wu, L., A.S. Multani, H. He, W. Cosme-Blanco, Y. Deng, J.M. Deng, O. Bachilo, S. Pathak, H. Tahara, S.M. Bailey, Y. Deng, R.R. Behringer, and S. Chang. 2006. Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell.* 126:49–62. doi:10.1016/j.cell.2006.05.037.
- Xin, H., D. Liu, M. Wan, A. Safari, H. Kim, W. Sun, M.S. O'Connor, and Z. Songyang. 2007. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature.* 445:559–562. doi:10.1038/nature05469.
- Ye, J.Z.-S., J.R. Donigian, M. van Overbeek, D. Loayza, Y. Luo, A.N. Krutchinsky, B.T. Chait, and T. de Lange. 2004. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J. Biol. Chem.* 279:47264–47271. doi:10.1074/jbc.M409047200.
- Yeager, T.R., A.A. Neumann, A. Englezou, L.I. Huschtscha, J.R. Noble, and R.R. Reddel. 1999. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* 59:4175–4179.
- Zaug, A.J., E.R. Podell, J. Nandakumar, and T.R. Cech. 2010. Functional interaction between telomere protein TPP1 and telomerase. *Genes Dev.* 24:613–622. doi:10.1101/gad.1881810.
- von Zglinicki, T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 27:339–344.
- Zhou, B.B., and S.J. Elledge. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 408:433–439. doi:10.1038/35044005.
- Zhou, X.Z., and K.P. Lu. 2001. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell.* 107:347–359.
- Zou, Y., A. Sfeir, S.M. Gryaznov, J.W. Shay, and W.E. Wright. 2004. Does a Sentinel or a Subset of Short Telomeres Determine Replicative Senescence? *Mol. Biol. Cell.* 15:3709–3718. doi:10.1091/mbc.E04-03-0207.